

СОДЕРЖАНИЕ

Том 87, № 6, 2022

Антивоспалительные свойства метформина в условиях культивации первичных астроцитов крысы в среде с повышенной концентрацией глюкозы <i>В.О. Горбатенко, С.В. Горяинов, В.А. Бабенко, Е.Ю. Плотников, М.Г. Сергеева, Д.В. Чистяков</i>	691
Помогут ли пептиды остановить Covid-19? (обзор) <i>В.Г. Круть, С.А. Чувпило, И.В. Астраханцева, Л.И. Козловская, Г.А. Ефимов, А.А. Круглов, М.С. Друцкая, С.А. Недоспасов</i>	707
Структурно модифицированные частицы вирусов растений и бактериофагов со спиральной структурой. Свойства и применение (обзор) <i>О.А. Кондакова, Е.А. Евтушенко, О.А. Баранов, Н.А. Никитин, О.В. Карпова</i>	727
25-Гидроксихолестерин как сигнальная молекула в нервной системе (обзор) <i>Ю.Г. Одношвикина, Е.А. Кузнецова, А.М. Петров</i>	741
Семафорин 3А в иммунной системе: двадцать лет изучения (обзор) <i>Е.П. Киселева, К.В. Рутто</i>	758
Т-лимфоциты как мишени для SARS-CoV-2 (обзор) <i>Е.М. Куклина</i>	780
Ингибиторное действие 7-метилгуанина и его метаболита 8-гидрокси-7-метилгуанина на поли(ADP-рибозо)полимеразу 1 человека <i>Т.А. Кургина, С.И. Шрам, М.М. Кутузов, Т.В. Абрамова, Т.А. Щербакова, Е.А. Мальцева, В.В. Поройков, О.И. Лаврик, В.К. Шведас, Д.К. Нилов</i>	794
Участие MAPK и PI3K в регуляции секреции цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови в ответ на комбинацию ЛПС <i>Escherichia coli</i> и rDer p 2 <i>А.А. Морозова, Н.И. Косякова, И.Р. Прохоренко</i>	804
Мультифункциональный фермент с эндоглюканазной и альгиназо/глюкуронан-лиазной активностью из бактерии <i>Cellulophaga lytica</i> <i>А.В. Лисов, С.С. Киселев, Л.И. Трубицина, О.В. Белова, Ж.И. Андреева-Ковалевская, И.В. Трубицин, Т.В. Шушкова, А.А. Леонтьевский</i>	816
Правила для авторов	829

CONTENTS

Vol. 87, Issue 6, 2022

Anti-Inflammatory Properties of Metformin During Cultivation of Primary Rat Astrocytes in a Medium with High Glucose Concentration <i>V. O. Gorbatenko, S. V. Goriainov, V. A. Babenko, E. Yu. Plotnikov, M. G. Sergeeva, and D. V. Chistyakov</i>	691
Can Peptides Help to Stop Covid-19? (Review) <i>V. G. Krut, S. A. Chuvpilo, I. V. Astrakhantseva, L. I. Kozlovskaya, G. A. Efimov, A. A. Kruglov, M. S. Drutskaya, and S. A. Nedospasov</i>	707
Structurally Modified Plant Viruses and Bacteriophages. Properties and Applications (Review) <i>O. A. Kondakova, E. A. Evtushenko, O. A. Baranov, N. A. Nikitin, and O. V. Karpova</i>	727
25-Hydroxycholesterol as a Signaling Molecule in the Nerve System (Review) <i>U. G. Odnoshivkina, E. A. Kuznetsova, and A. M. Petrov</i>	741
Semaphorin 3A in the Immune System: Twenty Years of Study (Review) <i>E. P. Kiseleva and K. V. Rutto</i>	758
T Lymphocytes as Targets for SARS-CoV-2 (Review) <i>E. M. Kuklina</i>	780
Inhibitory Effects of 7-Methylguanine and Its Metabolite 8-Hydroxy-7-Methylguanine on Human poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 <i>T. A. Kurgina, S. I. Shram, M. M. Kutuzov, T. V. Abramova, T. A. Shcherbakova, E. A. Maltseva, V. V. Poroikov, O. I. Lavrik, V. K. Švedas, and D. K. Nilov</i>	794
Participation of MAPK and PI3K in the Regulation of Cytokine Secretion by Peripheral Blood Mononuclear Cells in Response to <i>Escherichia coli</i> LPS and rDer p 2 Combination <i>A. A. Morozova, N. I. Kosyakova, and I. R. Prokhorenko</i>	804
Multifunctional Enzyme with Endoglucanase and Alginase/Glucuronan Lyase Activities from Bacterium <i>Cellulophaga lytica</i> <i>A. V. Lisov, S. S. Kiselev, L. I. Trubitsina, O. V. Belova, Z. I. Andreeva-Kovalevskaya, I. V. Trubitsin, T. V. Shushkova, and A. A. Leontievsky</i>	816
Instructions to Authors	829

УДК 612.017.1:612.112.31

АНТИВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МЕТФОРМИНА В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВАЦИИ ПЕРВИЧНЫХ АСТРОЦИТОВ КРЫСЫ В СРЕДЕ С ПОВЫШЕННОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ГЛЮКОЗЫ

© 2022 В.О. Горбатенко¹, С.В. Горяинов², В.А. Бабенко³, Е.Ю. Плотников³,
М.Г. Сергеева³, Д.В. Чистяков^{3*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

² Российский университет дружбы народов, 117198 Москва, Россия

³ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: chistyakov@gmail.com

Поступила в редакцию 14.04.2022

После доработки 10.05.2022

Принята к публикации 10.05.2022

Установление взаимосвязи между воспалительными ответами и энергетическим метаболизмом важно для понимания биологии хронических неинфекционных заболеваний. Использование метформина, препарата для лечения диабета, рассматривается как перспективное направление для терапии нейродегенеративных заболеваний и других нейропатологий с воспалительной компонентой. Астроциты играют важную роль в регуляции энергетического метаболизма и нейровоспаления, поэтому в работе исследовали влияние метформина на клеточные ответы первичных астроцитов крысы, культивируемых в среде с повышенной концентрацией глюкозы (22,5 мМ, инкубация в течение 48 ч). Как воспалительный стимул использовали липополисахарид (LPS). Эффекты метформина оценивали по изменению экспрессии провоспалительных цитокинов и синтеза оксипинов, детектируемых методом сверхэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (UPLC-MS/MS). Изменения на внутриклеточном уровне оценивались по анализу фосфорилирования ERK-киназы и транскрипционного фактора STAT3, ферментов синтеза оксипинов циклооксигеназы 1 и 2 (COX). Получено, что независимо от концентрации глюкозы метформин снижал LPS-стимулированное высвобождение цитокинов IL-1 β и IL-6, активность транскрипционного фактора STAT3, киназы ERK, синтез производных циклооксигеназной ветви метаболизма оксипинов и анандамида и не влиял на образование АФК. Исследование энергетического фенотипа клеток показало, что метформин активировал гликолиз и ингибировал митохондриальное дыхание и окислительное фосфорилирование независимо от стимуляции LPS и культивирования клеток при повышенной концентрации глюкозы. Таким образом, показано, что метформин обладает выраженными противовоспалительными эффектами, а его влияние на синтез цитокинов, простагландинов и других липидных медиаторов может обуславливать полезные эффекты метформина в моделях нейропатологий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: астроциты, гипергликемия, цитокины, оксипины, STAT3, ERK, АФК, полиненасыщенные жирные кислоты, анандамид, метформин.

DOI: 10.31857/S032097252206001X, EDN: ATTKWG

ВВЕДЕНИЕ

Наличие взаимосвязей между энергетическим метаболизмом, воспалением и различными хроническими неинфекционными заболеваниями подтверждается в серии исследований,

когда противовоспалительные или глюкозо-понижающие препараты используют для лечения этих заболеваний. Бигуанид метформин является препаратом первой линии (препаратом выбора) при лечении диабета 2-го типа. Глюкозоснижающий эффект метформина в первую

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; полиненасыщенные жирные кислоты: АА – арахидоновая, ДНА – докозагексаеновая, ЕРА – эйкозапентаеновая; АЕА – эндоканнабиноид анандамид; АМРК – АМР-активированная протеинкиназа; СОХ – циклооксигеназы; ЕСАР – скорость внеклеточного закисления; НГ – высокая концентрация глюкозы; ИЛ – интерлейкин; LPS – липополисахарид; НГ – нормальная концентрация глюкозы; ОСР – скорость потребления кислорода; TNF α – фактор некроза опухолей; РГ – простагландины.

* Адресат для корреспонденции.

очередь объясняется его способностью регулировать энергетический обмен, включая ингибирование глюконеогенеза в печени, снижение всасывания глюкозы и повышение утилизации глюкозы в периферических тканях [1]. На молекулярном уровне основным механизмом действия метформина, как ингибитора глюконеогенеза, рассматривают ингибирование комплекса I дыхательной цепи митохондрий, приводящее к активации АМР-активированной протеинкиназы (АМРК) и зависимых от этой киназы процессов [2].

Исследования последних лет также показали, что метформин оказывает благоприятное воздействие при патологиях нервной системы [1, 3]. Все эти заболевания характеризуются наличием хронических воспалительных процессов, определяемых на молекулярном уровне системой врождённого иммунитета, а также изменением взаимосвязи воспалительных и энергетических процессов [4, 5]. Найденные на разных моделях молекулярные механизмы действия метформина указывают на его противовоспалительные свойства, поскольку наблюдали снижение экспрессии таких маркёров воспалительного процесса, как циклооксигеназа 2 (COX-2) и индуцибельная NO синтаза (iNOS), цитокинов TNF α , IL-6 и IL-1 β [6–9]. В то же время отсутствуют данные по другому классу про- и противовоспалительных веществ: полиненасыщенным жирным кислотам и их метаболитам, оксипиринам. Остаётся также неясным, как проявляются противовоспалительные свойства метформина, когда наблюдаются и гипергликемия, и воздействие провоспалительных стимулов.

Астроциты — это глиальные клетки, которые имеют трофическую функцию и участвуют в поддержании гомеостаза [10, 11]. Показано также, что астроциты играют важную роль в нейровоспалении [4, 11]. В настоящее время клетки рассматривают как объекты для создания новых терапевтических подходов, дающих возможность разработать методы лечения острых травм и хронических заболеваний центральной нервной системы [10, 12]. Помимо их особой роли в нейровоспалении, астроциты вносят основной вклад в метаболизм глюкозы в головном мозге и её запасание в виде гликогена [13]. Опыты *in vivo* на различных моделях заболеваний нервной системы показали положительный эффект метформина и указали на важную роль астроцитов в этом процессе [14–17]. Эти работы положили начало исследованиям влияния метформина на различные функции астроцитов [12, 18–20].

Однако оставались неизученными зависимость эффектов метформина от адаптации астроцитов к разным концентрациям глюкозы и ключевой вопрос: меняются ли при такой адаптации противовоспалительные свойства метформина. Ранее нами было показано, что получение астроцитов и их длительное культивирование при высокой концентрации глюкозы сдвигают ответы в сторону проявления провоспалительных характеристик [5]. С другой стороны, показано, что ингибиторы окислительного фосфорилирования влияют на способность астроцитов синтезировать цитокины и оксипирины в ответ на противовоспалительные стимулы [21]. Поэтому данная работа была посвящена характеристике воздействия метформина на ответ астроцитов, стимулированных липополисахаридом (LPS). Астроциты перед стимуляцией культивировали при нормальной (5 мМ, NG) или высокой (22,5 мМ, HG) концентрации глюкозы. Проведена оценка изменения цитокинов и оксипиринов, дана характеристика энергетического метаболизма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. В работе использовали следующие реактивы: липополисахарид («Sigma-Aldrich», США); метформин гидрохлорид («Cayman Chemical Company», США); стрептомицин/пенициллин, трипсин, ЭДТА, бычья сыворотка («ПанЭко», Россия). Культуральная среда Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) («Gibco», «Thermo Fisher Scientific», США). Антитела против COX-2, COX-1, p44/42 MAPK (Erk1/2), фосфо-p44/42 MAPK (Erk1/2, Thr202/Tyr204), β -тубулина, β -актин, вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (кроличьи, мышинные) («Cell Signaling Technology», США); субстрат для вестерн-блота ECL («Thermo Fisher Scientific»). Дейтерированные стандарты оксипиринов: 6-keto PGF1 α -d4, TXB2-d4, PGF2 α -d4, PGE2-d4, PGD2-d4, LTC4-d5, LTB4-d4, 5(S)-HETE-d8, 12(S)-HETE-d8, 15(S)-HETE-d8, Oleoyl Ethanolamide-d4, EPA-d5, DHA-d5 и AA-d8 («Cayman Chemical Company»). Картриджи Oasis® PRIME HLB (60 мг, 3 мл) («Waters», Германия).

Первичная культура клеток астроцитов. Первичная, обогатённая астроцитами, клеточная культура была выделена из новорождённых (одно-, двухдневных) крысят обоих полов по методике, описанной ранее [22]. Вкратце,

Таблица 1. Последовательности праймеров к генам маркёров воспаления и конститутивного гена β -актина

Ген	Последовательности праймеров (5'→3')	
	прямой	обратный
<i>TNFα</i>	CAAGGAGGAGAAGTTCCCAA	TGATCTGAGTGTGAGGGTCTG
<i>IL-1β</i>	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG	GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC
<i>IL-6</i>	CTGGTCTTCTGGAGTTCCGT	TGGTCTTGGTCCTTAGCCAC
β -актин	AGATGACCCAGATCATGTTTGAG	GGCATAACAGGGACAACACAG

крысят обезглавливали, вскрывали черепную коробку и извлекали мозг по кусочкам, не захватывая соединительнотканые оболочки. Извлечённый мозг промывали охлаждённым раствором Пакса (137,0 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 0,44 мМ KH_2PO_4 , 0,3 мМ Na_2HPO_4 , pH 7,4) и последовательно перетирали через нейлоновые сита с порами 250 и 136 мкм. Полученные клетки помещали в культуральные флаконы площадью 75 см² с плотностью 6×10^5 клеток на мл и культивировали в среде DMEM, содержащей глюкозу (1 г/литр), 10% бычьей сыворотки (FBS), стрептомицин (50 ед/мл) и пенициллин (50 мкг/мл), при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO_2 . По истечении 5 дней проводили первую смену среды с предварительным отделением клеток микроглии на орбитальном шейкере OS-20 («Biosan», Латвия), 280 об./мин, 90 мин. Получившуюся обогащённую астроцитами культуру выращивали следующие 4 дня с заменой среды каждые 2 дня. Затем клетки промывали раствором Хенкса, отделяли трипсином от поверхности флакона и рассеивали по шести-луночным планшетах с плотностью 750 000 клеток на лунку с добавлением среды DMEM того же состава. За 48 ч до стимуляции клеток LPS клеточную среду меняли на DMEM, содержащий глюкозу 1 г/литр или 4,5 г/литр. За 24 ч до стимуляции LPS к клеткам добавлялся метформин в концентрации 2,5 мМ. Для данной концентрации метформина был проведён LDH-тест (набор для теста производства «Roche», США), результат, который показал отсутствие цитотоксичности в данной концентрации на клетках, снимали с помощью планшетного спектрофотометра Synergy H4 («BioTek», США) при длине волны 490 нм (данные не приведены).

Оценка изменения экспрессии генов. Суммарную мРНК выделяли с помощью набора для очистки РНК GeneJET («Thermo Scientific», США) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически с помощью спектрофо-

тометра NanoPhotometer N («Implen», США). Синтез первой цепи проводили с помощью MMLV RT kit («Евроген», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Относительный уровень экспрессии генов *TNF α* , *IL-1 β* , *IL-6* и β -актина (последовательности представлены в табл. 1) определяли с помощью количественной ПЦР с SYBR GREEN, используя коммерческий 5× PCR-HS-SYBR микс, («Евроген»), на амплификаторе DTLite 4 («DNATechnology», Россия).

Иммуноблоттинг для оценки внутриклеточных изменений. Методом иммуноблоттинга оценивалось изменение фосфорилирования ERK MAP-киназы и транскрипционного фактора STAT3, а также изменение количества белков циклооксигеназ 1 и 2 (COX-1, COX-2). Для этого астроциты, прошедшие клеточный эксперимент, лизировали в буфере RIPA (50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 1% NP-40 («Sigma Chemicals», США), 0,25% дезоксихолата натрия, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ Na_3VO_4 , 1 мМ NaF) с ингибиторами протеаз/фосфатаз («Roche Molecular Biochemicals», Германия). Концентрацию белка выравнивали дополнительным разведением. По достижении одинаковых концентраций образцы подвергали стандартному SDS-электрофорезу в 10%-ном ПААГ. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,2 мкм («Bio Rad», США) проводили по методу полусухого переноса в приборе Trans Blot sd («Bio Rad»). Далее мембраны инкубировали в буфере TBS, содержащем 5% обезжиренного молока и 0,05% (v/v) Tween 20, и маркировали первичными антителами против COX-1, COX-2, p-ERK, ERK, p-STAT3, STAT3 и β -тубулина. После инкубации мембран с раствором вторичных антител анализировали иммуномаркирование с использованием хемилюминесцентного субстрата. Фотосъёмку мембран проводили с применением камер фирмы «Bio Rad». Для количественного анализа экспрессии использовали приложение QuantityOne 4.6.9 («Bio Rad»).

Таблица 2. Методика расчёта параметров энергетического метаболизма по скорости потребления кислорода и скорости внеклеточного закисления, измеряемых с помощью Seahorse XFp

Параметр	Формула расчёта
Базальный гликолиз	(среднее ECAR между добавлением глюкозы и олигомицина) – (среднее ECAR перед добавлением глюкозы)
Гликолитическая способность	(среднее ECAR после добавления олигомицина) – (среднее ECAR перед добавлением глюкозы)
Негликолитическое закисление	среднее ECAR перед добавлением глюкозы
Максимальное дыхание	(среднее OCR после добавления CCCP) – (немитохондриальное потребление кислорода)
Олигомицин-чувствительное потребление кислорода	(среднее OCR перед добавлением олигомицина) – (среднее OCR после добавления олигомицина)
Дыхательная ёмкость	(максимальное дыхание) – (базальное дыхание)

UPLC-MS/MS для детекции липидов.

Для масс-спектрометрического анализа выбросов кислот и оксипептидов в клеточную среду к 700 мкл клеточной среды добавляли 1 мл охлаждённого метанола для осаждения белков, после чего липидные компоненты экстрагировали с использованием колонок Oasis® PRIME HLB для твердофазной экстракции («Waters», Германия), согласно рекомендациям производителя. Концентрирование образцов проводили в токе азота. Масс-спектрометрический анализ проводился с использованием квадрупольного масс-спектрометра Shimadzu 8040 («Shimadzu», Япония), который оборудован системой ультра-ВЭЖХ Nexera с использованием колонки Phenomenex C8 (2,1 мм × 150 мм × 2,6 мкм). Регистрацию проводили методом мониторинга множественных реакций по методике, описанной ранее [23]. Идентификацию липидов проводили с помощью программного обеспечения LipidMediators 2.0 Shimadzu.

Определение цитокинов при помощи иммуноферментного анализа. Уровень высвобожденного IL-6 был определён с использованием коммерческого набора для детекции IL-6 («BD Biosciences», США), согласно рекомендациям производителя. Детекцию проводили при помощи планшетного спектрофотометра Synergy H4.

Анализ выброса активных форм кислорода (АФК). Детектирование АФК проводили с использованием коммерческого набора CellROX® Deep Red Reagent («Thermo Scientific») в соответствии с рекомендациями производителя. Измерения возбуждение/излучение (640/665 нм) проводили на планшетном спектрофотометре Synergy H4.

Анализ энергетического метаболизма астроцитов.

Энергетический метаболизм клеток (скорость потребления кислорода (OCR) и скорость внеклеточного закисления (ECAR)) оценивали с помощью прибора Seahorse XFp Analyzer («Seahorse Bioscience», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для анализа астроциты высевали в количестве 5000 клеток на лунку и культивировали на планшетах Seahorse XFp («Agilent», США) в течение 24 ч. Далее среду в лунках планшета заменяли на реакционную, состоящую из DMEM, 5 мМ HEPES, пирувата натрия (1 мМ), глутамин (2 мМ), pH 7,4. В каждую лунку вносили по 180 мкл этой среды, её же добавляли в контрольные лунки. Далее инкубировали клетки в реакционной среде в течение 40 мин в инкубаторе без CO₂. К клеткам последовательно добавляли 10 мМ глюкозы; 4,5 мкМ ингибитора АТФ-синтазы – олигомицина; 10 мкМ разобщителя дыхания и окислительного фосфорилирования – CCCP (карбонилцианид м-хлорфенилгидразон); 2,5 мкМ ротенона и 4 мкМ антимицина А (ингибиторы комплексов I и III соответственно). Далее помещали планшет в прибор и проводили измерения. После каждой инъекции регистрировали 4 временные точки с примерно 5-минутным интервалом между каждой инъекцией. OCR и ECAR анализировали с помощью программного обеспечения Seahorse XFp. В соответствии с рекомендациями производителя рассчитывали ряд параметров энергетического метаболизма и функций митохондрий (табл. 2).

Полученные значения ECAR и OCR нормировали на количество клеток в лунках, которое определяли с помощью окрашивания ядер клеток с 4',6-диамидино-2-фенилиндо-

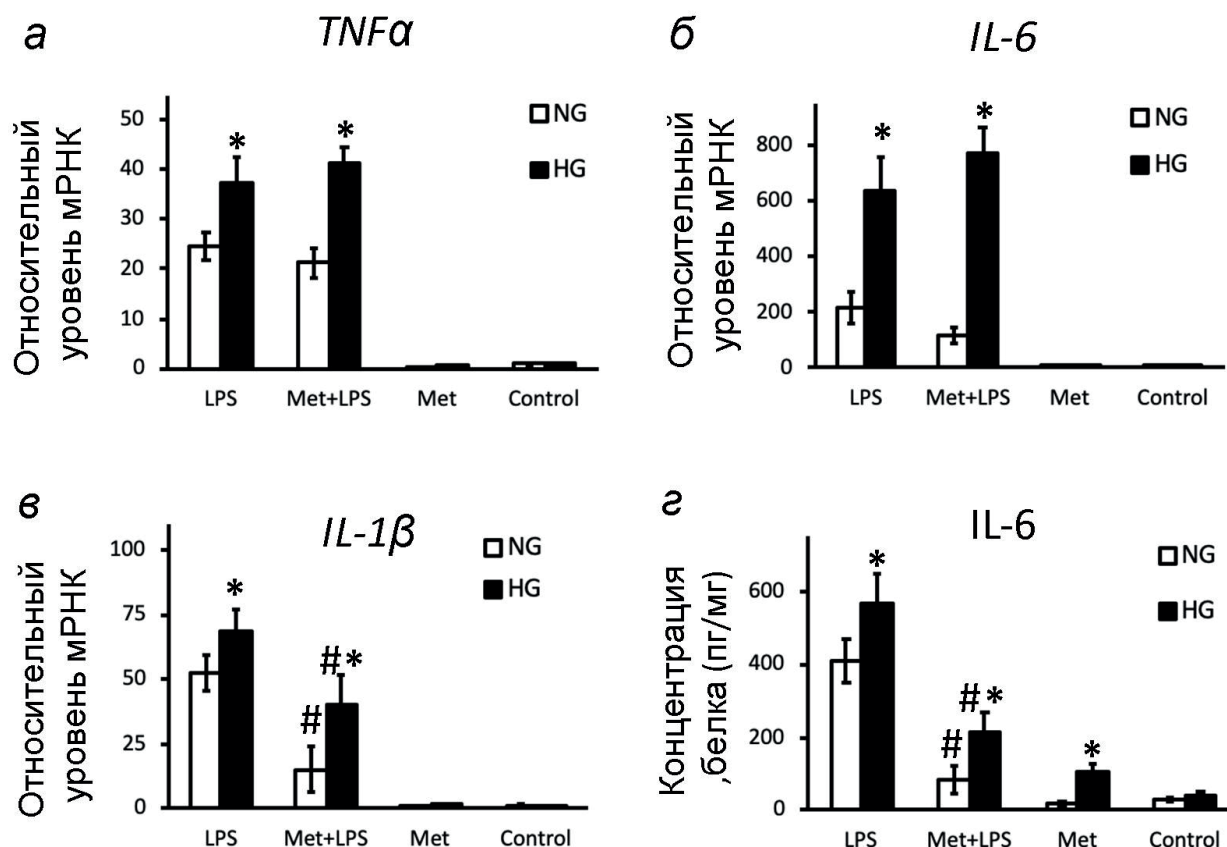


Рис. 1. Влияние метформина на LPS-стимулированную экспрессию генов цитокинов (*TNFα*, *IL-1β*, *IL-6*). Первичные астроциты крыс предварительно обрабатывали в течение 24 ч метформином (Met, 2,5 mM), а затем стимулировали липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл) в течение 4 ч. Экспрессию генов определяли методом qPCR, значения были нормализованы к уровням мРНК β-актина, за единицу принята экспрессия в контрольных клетках. Концентрацию IL-6 определяли методом ИФА, данные представлены в виде пг/мг белка. Значения представляют собой среднее ± стандартное отклонение среднего из трёх независимых экспериментов. * $p < 0,05$ по сравнению с клетками, культивируемыми в среде с NG; # $p < 0,05$ по сравнению с LPS-стимулированными клетками

лом (DAPI) после метаболического анализа. Для этого культуры в планшетах фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 15 мин при 4 °C. Зафиксированные клетки окрашивали раствором DAPI (300 нМ) в течение 20 мин, после чего получали изображения на конфокальном микроскопе («Carl Zeiss», Германия). Далее проводили подсчёт ядер в пяти полях зрения для каждой лунки и, взяв среднее от полученных значений, получали нормировочный коэффициент, в соответствии с которым корректировали полученные при анализе метаболизма данные.

Статистический анализ экспериментальных данных. Данные выражены как среднее ± стандартное отклонение. Статистическая значимость различий между группами оценивалась с помощью однофакторного теста ANOVA с уровнем значимости 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние метформина на LPS-стимулированный синтез цитокинов в астроцитах, культивируемых при разных концентрациях глюкозы. Ранее было показано, что LPS действует на астроциты через активацию толл-подобных рецепторов типа 4 (TLR4) [24], при этом происходит активация синтеза провоспалительных цитокинов и оксипинов [23]. Для оценки влияния метформина мы проанализировали LPS-стимулированную экспрессию генов провоспалительных цитокинов *TNFα*, *IL-1β* и *IL-6* (рис. 1, а–в). Для IL-6 также были проанализированы данные по высвобождению белка (рис. 1, г). Сравнивали клетки, культивируемые перед добавлением стимула 48 ч при 5 mM (NG, нормальная концентрация глюкозы) и 22,5 mM (HG, модель клеточной гипер-

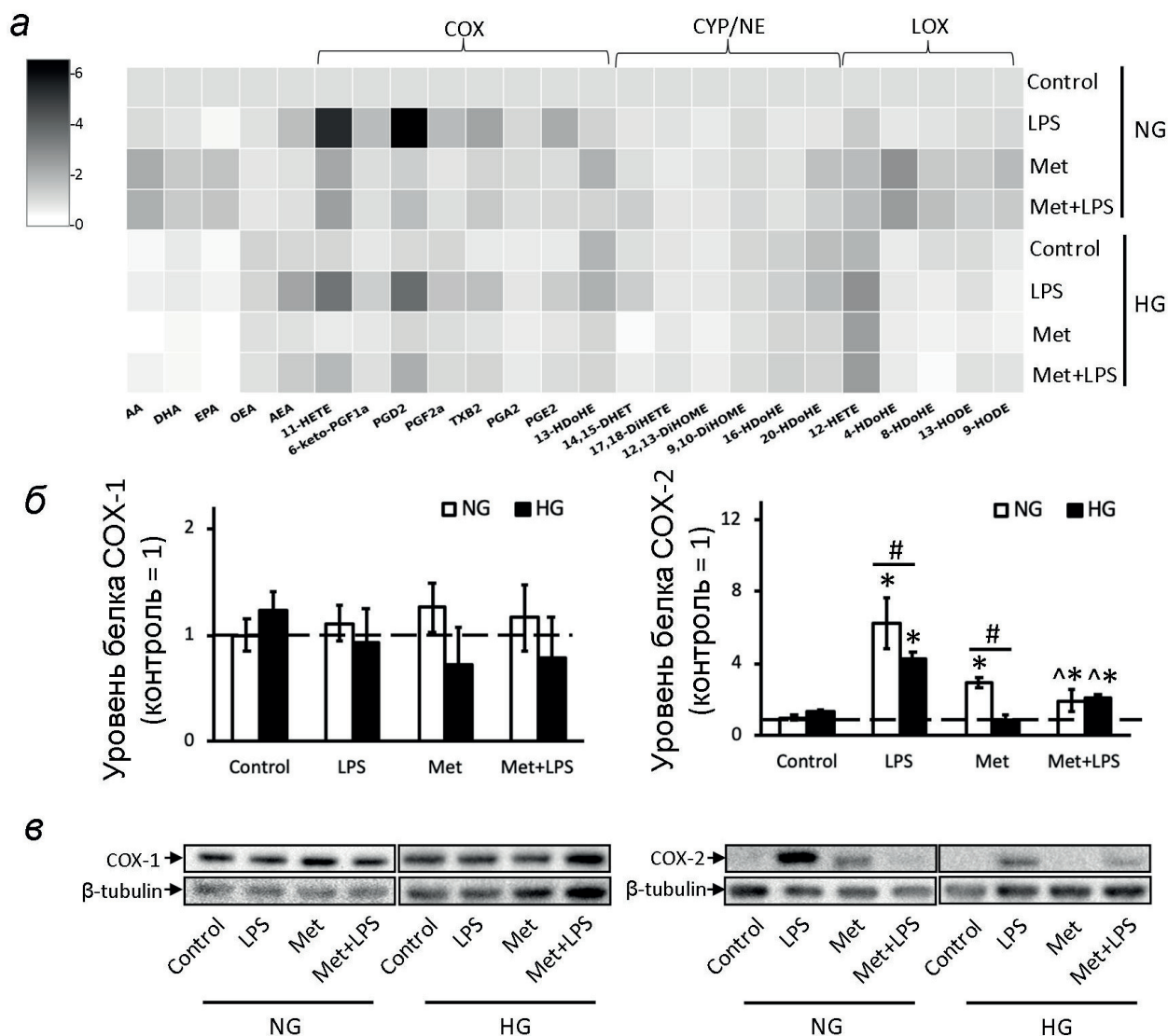


Рис. 2. Влияние метформина (Met) на высвобождение оксипинов и полиненасыщенных жирных кислот в астроцитах, стимулированных LPS, и экспрессию ферментов COX-1 и COX-2. Первичные астроциты крыс предварительно обрабатывали в течение 24 ч метформином (Met, 2,5 мМ), а затем стимулировали липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл) в течение 4 ч. Концентрации липидов в супернатантах измеряли с помощью сверхэффективной жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии (UPLC-MS/MS). *а* – На тепловой карте показаны относительные количества каждого липидного медиатора по сравнению с контролем NG. На вертикальной оси отмечены клеточные стимулы, а на горизонтальной оси отложено относительное количество каждого липидного медиатора. Метаболиты были разделены на: липоксигеназный (LOX), циклооксигеназный (COX) и цитохромный/неферментативный (CYP/NE) пути, участвующие в их синтезе. *б* и *в* – Уровни белка COX-1 и COX-2 оценивали с помощью вестерн-блота и нормализовали по отношению к уровню экспрессии β -тубулина; *б* – результаты денситометрии представлены по отношению к контрольным, не стимулированным клеткам NG; *в* – приведены репрезентативные изображения вестерн-блота для соответствующих белков. Значения представляют собой среднее $\pm$ стандартное отклонение среднего из трёх независимых экспериментов. * $p < 0,05$ по сравнению с нестимулированными клетками; # $p < 0,05$ при сравнении влияния глюкозы на идентичные обработки; ^ $p < 0,05$ по сравнению с LPS-стимулированными клетками, культивируемыми в среде с соответствующей концентрацией глюкозы

гликемии) глюкозы. Получено, что ответ на LPS меняется после культивации в HG-глюкозе в сторону увеличения экспрессии *TNF α* , *IL-6* и *IL-1 β* . Сам метформин не влиял на экспрессию исследуемых веществ, однако снижал LPS-индуцируемую экспрессию *IL-1 β* независимо от

концентрации глюкозы. На уровне высвобождения *IL-6* во внеклеточную среду также наблюдали влияние метформина независимо от концентрации глюкозы (рис. 1, *з*).

Зависимость синтеза оксипинов от концентрации глюкозы в астроцитах,

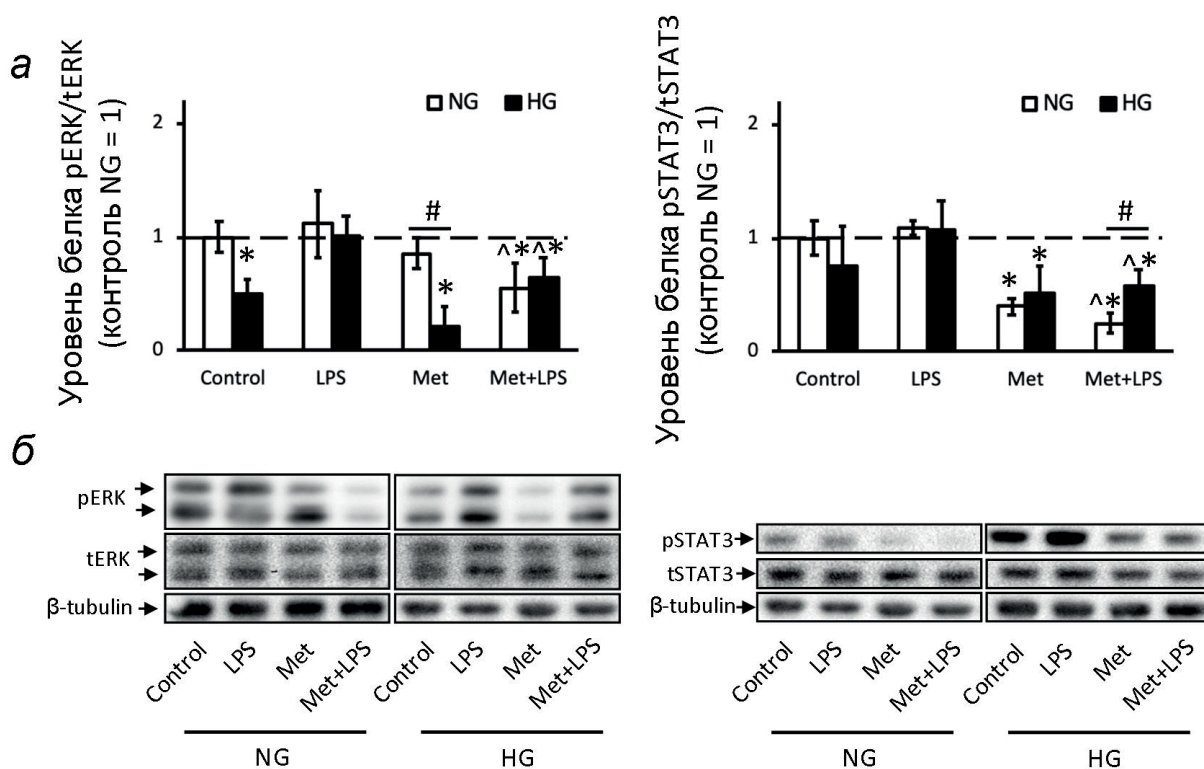


Рис. 3. Влияние глюкозы на активность MAPK, ERK1/2 и транскрипционного фактора STAT3 в астроцитах, предобработанных метформином и стимулированных LPS. Первичные астроциты крыс предварительно обрабатывали в течение 24 ч метформином (Met, 2,5 mM), а затем стимулировали липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл) в течение 4 ч. Уровни фосфорилированной формы белка (p-STAT3, p-ERK) и общей формы белка (t-STAT3, t-ERK) оценивали с помощью вестерн-блота и нормализовали по отношению к уровню экспрессии β-тубулина. *а* – Результаты денситометрии представлены по отношению к контрольным, нестимулированным клеткам. *б* – Приведены репрезентативные изображения вестерн-блота для соответствующих белков. Значения представляют собой среднее ± стандартное отклонение среднего из трёх независимых экспериментов. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольными клетками культивируемыми в среде с NG; # $p < 0,05$ при сравнении влияния глюкозы на идентичные обработки; ^ $p < 0,05$ по сравнению с LPS-стимулированными клетками, культивируемыми в среде с соответствующей концентрацией глюкозы

стимулированных LPS. Известно, что профиль синтезируемых астроцитами оксипинов может быть как про-, так и противовоспалительным по свойствам в зависимости от стимула и концентрации глюкозы в среде культивирования [5, 23, 25]. Поэтому мы оценили влияние метформина на LPS-стимулированный синтез оксипинов. Данные по 24 анализируемым оксипинам и полиненасыщенным жирным кислотам представлены на рисунке в Приложении и в виде тепловой карты (рис. 2, *а*). Детектируемые соединения можно разделить на следующие группы: 1) полиненасыщенные жирные кислоты – арахидоновая (AA), эйкозапентаеновая (EPA), докозагексаеновая (DHA); 2) эндоканнабиноид анандамид (AEA) и олеил-этаноламид (OEA); 3) оксипины циклооксигеназной (COX) ветви метаболизма – простагландины (PGE₂, 6-keto-PGF_{1α}, PGD₂, PGF_{2α}, PGA₂), тромбоксан B₂ (TXB₂), 11-HETE (11-гидрокси-эйкозатетраеновая кис-

лота), 13-HDoHE (13-гидроксидокозагексаеновая кислота); 4) оксипины цитохромного пути и неферментативного окисления (CYP/NE) – дигидроксиэйкозатетраеновые кислоты (DiHETE); 5) оксипины липооксигеназного (LOX) пути – гидроксидокозагексаеновые кислоты (HdoHE), гидроксидокозагексаеновые кислоты (HODE).

Получено, что культивация клеток в среде с HG снижает базовый уровень AA и EPA, при этом LPS не влияет на высвобождение кислот во внеклеточную среду. В среде с NG метформин стимулирует высвобождение всех кислот независимо от стимуляции клеток LPS, при гипергликемии метформин не влияет на этот процесс. Из веществ, которые относят к эндоканнабиноидам, LPS стимулировал синтез AEA вне зависимости от концентрации глюкозы, и метформин снижал этот эффект; синтез OEA оставался неизменным при всех обработках (рис. 2, *а* и рисунок в Приложении).

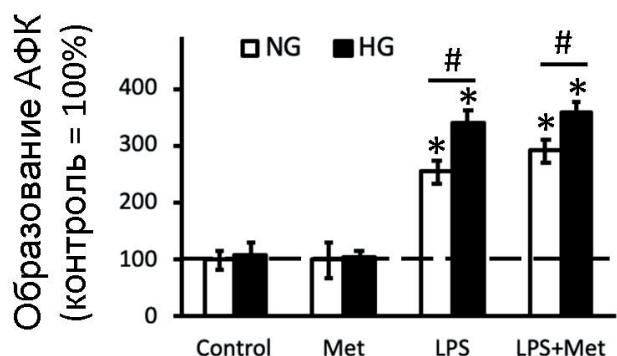


Рис. 4. Влияние метформина на продукцию АФК астроцитами, адаптированными к НГ и NG при стимуляции LPS. Первичные астроциты крыс предварительно обрабатывали в течение 24 ч метформином (Met, 2,5 mM), стимулировали липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл) в течение 24 ч. Уровень АФК измеряли с помощью реактива CellROX® Deep Red Reagent, как описано в разделе «Материалы и методы». Значения представляют собой среднее $\pm$ стандартное отклонение среднего из трёх независимых экспериментов. * $p < 0,05$ по сравнению с нестимулированными клетками; # $p < 0,05$ при сравнении влияния глюкозы на идентичные обработки

При культивировании клеток в среде с НГ для метаболитов, синтезируемых по COX-пути, при действии LPS наблюдается снижение выброса производных арахидоновой кислоты: 11-NETE, 6-keto-PGF α 1, PGD α 2, TXB α 2, PGE α 2. Метформин снижает LPS-стимулированный синтез COX-производных оксипинов независимо от концентрации глюкозы (рис. 2, а и рисунок в Приложении).

Для CYP/NE-производных мы не наблюдали активации от действия LPS и влияния метформина на эту активацию вне зависимости от концентрации глюкозы в среде (рис. 2, а и рисунок в Приложении). Для группы LOX-производных наблюдали повышение синтеза ДНА-метаболитов, синтезируемых по этому ферментативному пути – 8-HDoHE, 13-HDoHE и 4-HDoHE под действием метформина, причём этот эффект наблюдался только в условиях NG.

Синтез простагландинов определяется циклооксигеназами (COX): конститутивной (COX-1) и индуцибельной (COX-2). Мы проверили изменения этих изоформ в тестируемых условиях (рис. 2, б и в). Получено, что в нестимулированных клетках экспрессия циклооксигеназ COX-1 и COX-2 не зависит от концентрации глюкозы. Экспрессия COX-1 не меняется в ответ на стимулы. Экспрессия COX-2 для НГ меньше, по сравнению с условиями NG, при этом метформин снижает LPS-индуцированную экспрессию COX-2 независимо от концентрации глюкозы. Интересно отметить, что в

условиях NG без стимула метформин оказывает стимулирующий эффект на экспрессию COX-2. Данные по экспрессии COX-2 согласуются с наблюдаемым снижением уровня оксипинов, которые образуются через циклооксигеназный путь метаболизма жирных кислот.

Определение внутриклеточных молекулярных механизмов, участвующих в реализации эффектов метформина при разных концентрациях глюкозы. Известно, что стимуляция астроцитов LPS приводит к активации митогенактивируемой протеинкиназы (MAPK) ERK [26] и фактора транскрипции STAT3 [27]. На макрофагах было показано, что метформин снижает LPS-стимулированный рост фосфорилирования ERK [28], а в модели *in vivo* повреждения спинного мозга на крысах обнаружено, что метформин снижает активацию STAT3 в астроцитах [16]. Поэтому в поиске внутриклеточных сигнальных механизмов, реализующих эффект метформина при действии различной концентрации глюкозы, мы использовали метод иммуоблоттинга для оценки активности ERK-киназы и транскрипционного фактора STAT3 (рис. 3). Получено, что повышенная концентрация глюкозы снижает активность киназы ERK (рис. 3, а) и не влияет на STAT3 (рис. 3, б). Активность всех белков при стимуляции LPS не зависит от концентрации глюкозы. Метформин снижает эффект LPS-стимулируемой активации ERK и STAT3, причём этот эффект проявляется независимо от присутствия LPS (рис. 3, а и б). Выраженность клеточного ответа астроцитов при обработке метформином меняется в зависимости от концентрации глюкозы, при которой культивируются клетки.

Влияние метформина на LPS-стимулированное образование АФК. Известно, что НГ может повышать уровень АФК в глиальных клетках [29, 30], и при стимуляции клеток LPS индуцирует высвобождение АФК [31], поэтому мы охарактеризовали индукцию АФК в наших экспериментальных условиях (рис. 4). Получено, что глюкоза не влияет на базовый уровень АФК, но НГ увеличивает уровень АФК в ответ на LPS. Метформин не влияет на выброс АФК в данных экспериментальных условиях.

Анализ влияния метформина на энергетический метаболизм астроцитов, культивируемых при различной концентрации глюкозы при стимуляции LPS. Известно, что метформин при введении *in vivo* уменьшает уровень АТФ в гиппокампе и окислительное фосфорилирование в астроцитах *in vitro* [15]. Показано,

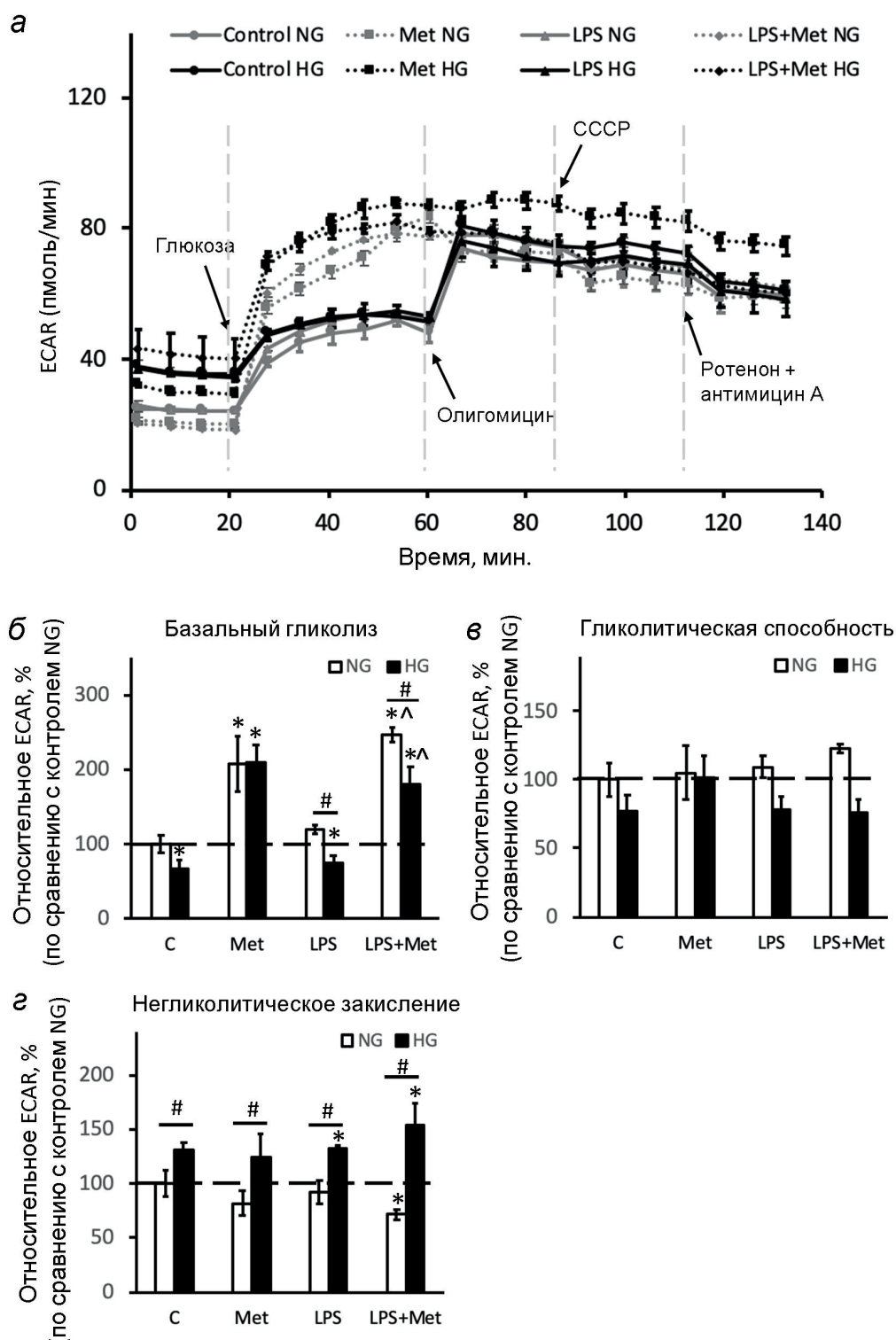


Рис. 5. Влияние метформина на активность гликолиза астроцитов, адаптированных к HG и NG при стимуляции LPS. *а* – Изменение скорости внеклеточного закисления культурами астроцитов при добавлении субстрата гликолиза (глюкоза), ингибитора окислительного фосфорилирования (олигомицин), разобщителя (СССР) и ингибиторов дыхательной цепи (ротенон + антимицин А). На диаграммах представлены рассчитываемые по ECAR базальный гликолиз (*б*), гликолитическая способность (*в*) и негликолитическое закисление (*г*). Значения представляют собой среднее $\pm$ стандартное отклонение среднего из трёх независимых экспериментов, за 100% взято значение ECAR в нестимулированных клетках NG. * $p < 0,05$ по сравнению с нестимулированными клетками NG; # $p < 0,05$ при сравнении влияния глюкозы на идентичные обработки; ^ $p < 0,05$ по сравнению с LPS-стимулированными клетками, культивируемыми в среде с соответствующей концентрацией глюкозы

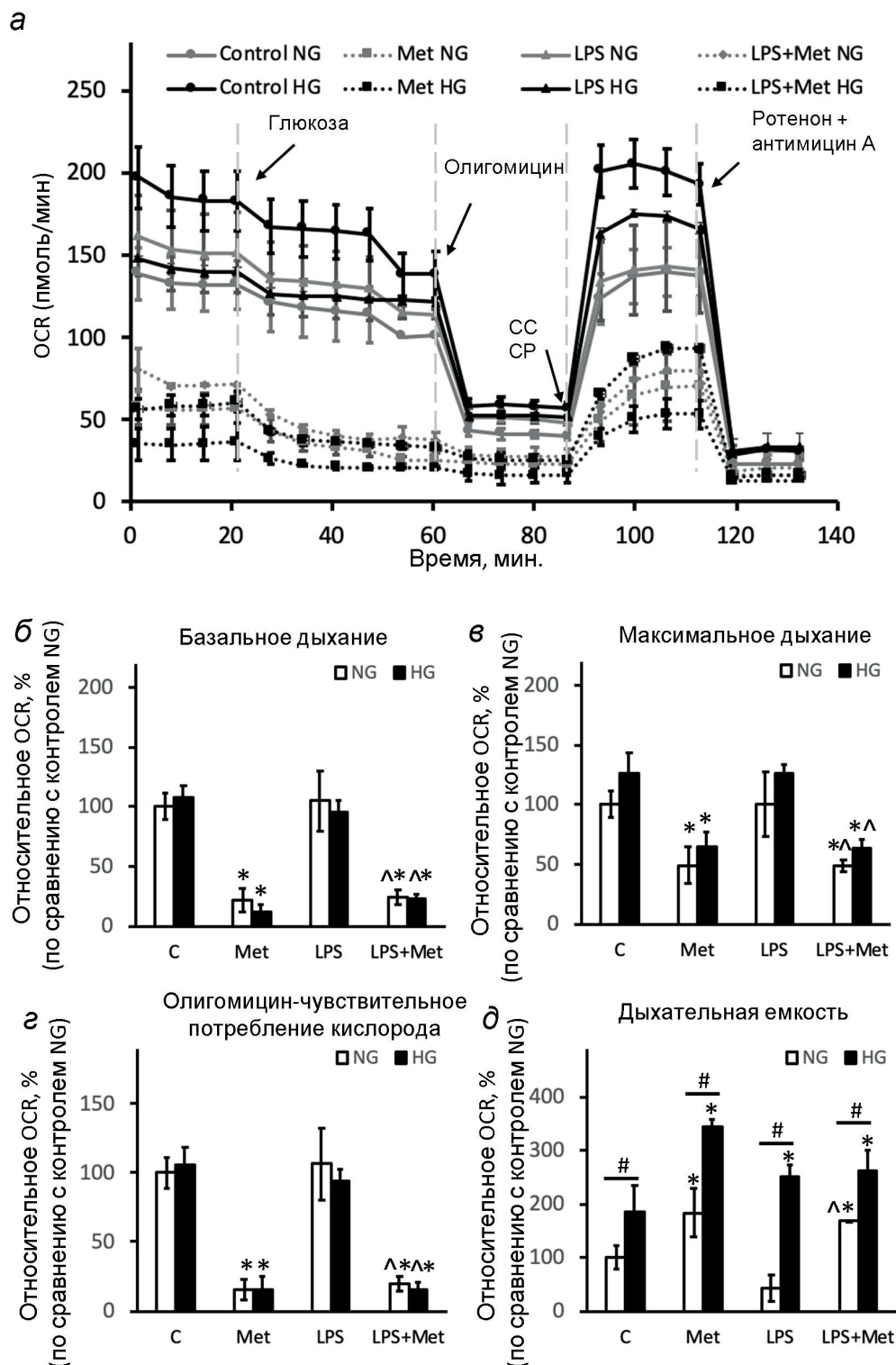


Рис. 6. Влияние LPS на митохондриальные функции астроцитов, оценённые с помощью анализатора Seahorse XFp. *а* — Скорость потребления кислорода культурами астроцитов; Расчётные значения параметров дыхания астроцитов: базальное дыхание (*б*), максимальное стимулированное дыхание (*в*), олигомицин-чувствительное потребление кислорода (*г*), дыхательная ёмкость (*д*). Значения представляют собой среднее $\pm$ стандартное отклонение среднего из трёх независимых экспериментов, за 100% взято значение OCR в нестимулированных клетках, культивируемых в среде с NG. * $p < 0,05$ по сравнению с нестимулированными клетками, культивируемыми в среде с NG; # $p < 0,05$ при сравнении влияния глюкозы на идентичные обработки; ^ $p < 0,05$ по сравнению с LPS-стимулированными клетками, культивируемыми в среде с соответствующей концентрацией глюкозы

что высокий уровень глюкозы в среде культивирования влияет на энергетический метаболизм астроцитов [29]. Однако ранее не было проведено сравнения изменения LPS-стимулированного энергетического метаболизма астроцитов, культивируемых при различных уровнях глюкозы, не оценена возможность модуляции метформином этого процесса. Для характеристики изменений дыхания и гликолиза в культивируемых астроцитах мы использовали анализатор метаболических потоков Seahorse XFp: оценивали скорость внеклеточного закисления (ECAR, мрН/мин) и скорость потребления кислорода (OCR, пмоль O_2 /мин).

Влияние метформина на ECAR в LPS-стимулированных астроцитах. Анализ скорости внеклеточного закисления астроцитов, стимулированных LPS и предварительно обработанных метформином по сравнению с клетками, не обработанными LPS, представлен на рис. 5. Каждая кривая на рис. 5 описывает изменение ECAR в клетках в исходных условиях (при отсутствии глюкозы в реакционной среде), а также после добавления D-глюкозы, олигомицина, CCCP и ротенона с антимицином А. Каждой точке соответствуют усреднённые значения измерений из трёх лунок для каждой из сравниваемых культур астроцитов (рис. 5, а).

Анализ энергетического метаболизма культур астроцитов показал, что культивирование астроцитов в среде с HG снижает уровень базального гликолиза и гликолитической способности как в нативных, так и в LPS-стимулированных клетках, при этом увеличивая уровень негликолитического закисления (рис. 5, б). LPS при описанном протоколе инкубаций не влиял на уровень базального гликолиза, гликолитическую способность или негликолитическое закисление. При этом культивирование клеток в среде с HG снижало уровень базального гликолиза как в контрольных клетках, так и в LPS-стимулированных клетках. В то же время предобработка астроцитов метформином перед стимуляцией LPS повышала уровень базального гликолиза по сравнению с LPS-стимулированными клетками, но не влияла на гликолитическую способность.

Влияние метформина на OCR в LPS-стимулированных астроцитах. Мы оценили влияние метформина и LPS на астроциты, культивируемые в среде с нормальной (5 мМ) и повышенной (22,5 мМ) концентрацией глюкозы; на скорость потребления кислорода (OCR), отражающую клеточное дыхание, в базальных

условиях и после последовательного добавления веществ, влияющих на перенос электронов в дыхательной цепи и окислительное фосфорилирование (рис. 6).

Сравнительный анализ дыхания астроцитов, культивированных в средах с разным содержанием глюкозы, показал, что культуры значимо не отличались по таким параметрам, как базальное дыхание, максимальное дыхание после добавления разобщителя и олигомицин-чувствительное потребление кислорода. Однако культивирование астроцитов в среде с HG приводило к повышенному уровню параметра дыхательной ёмкости, которая рассчитывается как разница между максимальным разобщённым дыханием и базальным дыханием (после добавления D-глюкозы) (рис. 6). При этом метформин значительно снижал как базальное дыхание, так и скорость максимального дыхания после разобщителя и олигомицин-чувствительное дыхание вне зависимости от концентрации глюкозы в среде, повышая при этом свободную дыхательную способность астроцитов. Важно отметить, что предобработка астроцитов метформином перед стимуляцией клеток LPS повышала дыхательную ёмкость, но только для астроцитов, культивируемых в среде с NG, не влияя на клетки, культивируемые в среде с HG.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время предложены различные экспериментальные клеточные модели гипергликемии астроцитов (с различными концентрациями глюкозы и временем обработки), в которых сообщалось о сдвиге клеточного ответа в сторону увеличения экспрессии и высвобождения провоспалительных цитокинов [22, 30, 31]. Полученные нами данные на модели 48 ч предобработки клеток высокой концентрацией глюкозы также показывают, что ответ на LPS сдвигается в сторону увеличения синтеза $TNF\alpha$, IL-6 и IL-1 β . При этом метформин снижает высвобождение цитокинов независимо от концентрации глюкозы, снижая синтез интерлейкинов IL-1 β и IL-6. Ранее в литературе была показана противовоспалительная способность метформина, предобработка которым способна снижать экспрессию IL-6 в LPS-стимулированных макрофагах [32], а также снижает выброс IL-1 β в клеточной линии BV2 [33]. Интересно, что в нашей модели не было влияния мет-

формина на TNF α , что отмечалось и на линии микроглии [33]. Можно заключить, что противовоспалительные эффекты метформина схожи для различных типов клеток, не зависят от концентрации глюкозы в среде, однако имеют множественные точки воздействия на сигнальные пути, что может давать вариации для различных цитокинов в контексте специфичности их регуляции в разных типах клеток.

В пользу предположения о не прямой связи между антигликемическими и противовоспалительными эффектами метформина указывают и полученные нами данные о независимом от гипергликемии воздействии метформина на активность транскрипционного фактора STAT3. Ранее в модели *in vivo* повреждения спинного мозга на крысах было показано, что метформин снижает активацию STAT3 в астроцитах [16]. Наши данные *in vitro* по снижению активности STAT3 при действии метформина согласуются с этим исследованием. Эффект метформина проявляется независимо от стимуляции LPS, хотя усиливается в его присутствии. Ранее также была показана взаимосвязь LPS, STAT3 и IL-6 в клетках мозга и зависимость синтеза IL-6 от уровня активности STAT3 [34]. Наши данные также указывают на возможность существования такой взаимосвязи, поскольку мы наблюдали снижение уровней высвобождения IL-6 и активности STAT3 при действии метформина. Интересно, что более выраженный эффект метформина, как противовоспалительного вещества, наблюдается при культивации клеток в среде с NG.

Ранее было показано, что метформин снижает LPS-стимулированный рост фосфорилирования ERK в макрофагах [28]. Известно, что стимуляция астроцитов LPS приводит к активации ERK [26]. Наши результаты показывают, что метформин снижает LPS-стимулированную активность ERK вне зависимости от концентрации глюкозы. Интересно, что активность ERK в клетках, культивируемых при высокой концентрации глюкозы, значительно ингибируется в присутствии метформина и без стимуляции LPS. Хотя сложно сопоставлять первичные клетки и линии клеток, следует отметить, что на линии SH-SY5Y (нейробластома) снижение активности ERK наблюдали при дефиците глюкозы в среде культивирования [35]. Заманчиво предположить, что есть система, которая регулирует гомеостаз клеток относительно отклонения концентрации внеклеточной глюкозы от нормы, и ERK относится к этой системе.

В контексте взаимосвязи энергетических процессов клеток и их способностью отвечать на действие провоспалительных стимулов наименее изученной остаётся система метаболизма оксипиринов. Ранее нами было проведено сравнение LPS-стимулированного синтеза оксипиринов на астроцитах, которые были с самого начала выделения адаптированы к NG или HG в течение 12 дней [5]. Такая длительная адаптация клеток к глюкозе приводила к сдвигу в сторону провоспалительного состояния у HG-культур: увеличение оксипиринов СОХ-ветви метаболизма, при этом проявлялась толерантность клеток к действию LPS, т.е. снижение индуцируемого синтеза в условиях гипергликемии. Сравнивая модели обработки астроцитов глюкозой в течение 12 дней [5] и 2 дней, можно отметить сходство по направлению эффекта глюкозы на синтез индуцируемых СОХ-производных, хотя при 12 днях инкубации в среде с HG эффекты толерантности значительно более выраженные.

Различия между моделями наблюдались по высвобождаемым кислотам. При гипергликемии для 12-дневной культуры детектировали увеличение высвобождаемых полиненасыщенных жирных кислот (AA, DHA, EPA), для 2-дневной обработки детектировали снижение выброса AA и EPA. Метформин не оказывал эффекта на высвобождение кислот в условиях HG, однако значительно увеличивал концентрацию кислот в условиях NG. Механизм этого не ясен, однако имеющиеся данные позволяют сделать предположение о независимой регуляции синтеза оксипиринов и высвобождения полиненасыщенных жирных кислот во внеклеточную среду, высказанное нами ранее [5].

При действии LPS наблюдалось значительное увеличение синтеза производных СОХ-ветви метаболизма оксипиринов как в условиях NG, так и в HG, при этом в условиях HG ответ был менее выраженным по сравнению с NG. Это соответствует данным, полученным с 12-дневной моделью. Данные по экспрессии СОХ-2 согласуются с наблюдаемым снижением уровня оксипиринов, синтезируемых по СОХ-ветви метаболизма, при этом метформин ингибировал синтез этих соединений.

Из детектируемых оксипиринов значимое различие проявлял эндогенный каннабиноид анандамид (AEA), синтез которого при стимуляции LPS был увеличен при HG. В литературе практически отсутствуют исследования в этой области, не понятна до конца роль са-

мого анандамида. В модели диабета на крысах было показано, что терапия животных анандамидом снижала депрессивно-подобное поведение и параметры окислительного стресса у животных [36], т.е. можно предположить, что анандамид, скорее, можно отнести к противовоспалительным соединениям. Однако в нашей экспериментальной модели метформин ингибировал синтез АЕА, что соответствует данным на других тканях, где АЕА в крови был маркером заболевания, а введение метформина снижало концентрацию АЕА и выраженность синдрома поликистоза яичников [37].

Известно, что условия гипергликемии вызывают в глиальных клетках увеличение продукции АФК [38, 31]. На кардиомиоцитах было показано, что LPS стимулирует АФК и эффект усиливается при повышении концентрации глюкозы [39]. Мы наблюдали увеличение выброса АФК астроцитами при стимуляции клеток LPS, при этом повышение концентрации глюкозы усиливало выброс цитоплазматических АФК. Интересно, что метформин не оказывал эффекта на LPS-стимулируемый синтез АФК независимо от концентрации глюкозы, что совпадает с ранее полученными данными для макрофагов [40].

Мы наблюдали независимость гликолитической способности астроцитов от всех обработок (концентрации глюкозы, стимуляция LPS, добавление метформина или метформина с LPS), повышение при гипергликемии негликолитического закисления при всех обработках. Метформин оказывал влияние только на базальный гликолиз, причём независимо от того, при какой концентрации глюкозы активировали клетки. Интересно, что такое же, только с обратным знаком, влияние метформина оказывал на базальное дыхание митохондрий и окислительное фосфорилирование. Ранее в работе Li et al. [15] на астроцитах мыши было показано, что миллимолярная доза метформина снижает окислительное фосфорилирование в клетках. При этом в проведённых нами экспериментах метформин значительно снижал как базальное дыхание, так и максимальное (стимулированное разобщителем) дыхание, и олигомицин-чувствительное дыхание (отражает активность окислительного фосфорилирования) независимо от концентрации глюкозы в среде, при этом повышая дыхательную ёмкость астроцитов, т.е. возможность увеличивать потребление кислорода при действии разобщителя (что косвенно указывает на возрастание

количества дыхательных комплексов в митохондриях). Ранее показано, что метформин на астроцитах усиливал потребление глюкозы и выделение лактата, блокировал цикл трикарбоновых кислот и дыхание митохондрий [20]. Следует отметить, что стимуляция 4 ч LPS не приводит к значимым изменениям в энергетическом метаболизме клеток, культивируемых в нормальных условиях. Некоторые изменения видны для клеток, культивируемых в условиях гипергликемии, но неясно, оказывают ли эти изменения влияние на синтез цитокинов и оксипиринов при воспалительном ответе.

Интересно наблюдаемое явление — повышение базального гликолиза и снижение базального митохондриального дыхания, окислительного фосфорилирования и максимального дыхания под действием метформина, что характеризует метаболическое перепрограммирование астроцитов, ведущее к изменению типа биоэнергетики с преимущественно аэробного дыхания на гликолиз. Данное явление впервые было описано Варбургом для опухолевых клеток, однако к настоящему времени Варбург-подобный сдвиг энергетического метаболизма известен для множества типов клеток, в том числе и для клеток мозга [41]. Механизмы, лежащие в основе переключения метаболизма с митохондриального дыхания на преимущественно гликолитические, включают в себя активацию транспорта глюкозы (в том числе через усиление экспрессии GLUT1) и ферментов гликолиза (например, гексокиназы). Также регуляторным звеном в снижении митохондриального дыхания и параллельном увеличении гликолитического метаболизма является пируватдегидрогеназный комплекс, который направляет продукт гликолиза (пируват) на окисление в митохондриях [42], при его ингибировании происходит снижение дыхания и усиление гликолиза. Для раковых клеток уже было показано, что метформин способствует метаболическому сдвигу в сторону гликолиза, в частности через активацию GLUT1 [43]. Аналогичные изменения известны для лимфоцитов, где усиление потребления глюкозы также связано с инсулиновым сигналингом и усилением экспрессии GLUT1 [44]. Мы впервые в данной работе показываем Варбург-подобный эффект у астроцитов, который может иметь очень важное значение для работы мозга. Известно, что одним из наиболее активно используемых энергетических субстратов для нейронов является лактат, причём производят его в основ-

ном астроциты, выбрасывая во внеклеточное пространство, откуда его поглощают близлежащие нейроны [45]. То есть астроглия выполняет роль производителя основного топлива для работы нейронов. При действии метформина основной наблюдаемый нами эффект — увеличение закисления внеклеточной среды в результате выброса лактата. Таким образом, усиление гликолиза может обуславливать увеличение трофических функций астроцитов. Отметим также, что митохондрии являются одним из основных потребителей жирных кислот, которые выполняют функцию энергетического субстрата, поэтому уменьшение митохондриального дыхания при действии метформина может приводить и к модуляциям синтеза оксипинов.

В настоящее время метформин считается привлекательным препаратом для терапии нейровоспаления, однако в ряде случаев отмечаются и побочные эффекты его применения [14]. Эффекты метформина связывают в первую очередь с его способностью регулировать энергетические процессы в клетках. Астроциты являются глиальными клетками, которые играют ключевую роль в обмене глюкозы и в поддержании гомеостаза нервной системы, в том числе регуляции ответов врождённого иммунитета при различных воздействиях. В нашей работе выявлено, что на астроцитах, отвечающих на провоспалительный стимул LPS, противовоспа-

лительные эффекты метформина не связаны напрямую с его влиянием на энергетический метаболизм. Такая разобщённость между двумя эффектами (влияние на энергетический обмен и противовоспалительный эффект), обнаруженная нами при применении метформина, должна быть учтена при разработке терапевтических подходов, сфокусированных на модуляции функций астроцитов в различных патологиях нервной системы.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-74-00068).

Благодарности. Мы благодарны Программе развития МГУ за предоставленный доступ к конфокальному микроскопу Zeiss LSM900.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Работу с лабораторными животными проводили в соответствии с требованиями Комиссии по биоэтике НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского. Все манипуляции выполняли в соответствии с руководством Федерации европейских научных ассоциаций по лабораторным животным.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bai, B., and Chen, H. (2021) Metformin: A novel weapon against inflammation, *Front. Pharmacol.*, **12**, 622262, doi: 10.3389/fphar.2021.622262.
2. Foretz, M., Guigas, B., and Viollet, B. (2019) Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **15**, 569-589, doi: 10.1038/s41574-019-0242-2.
3. Markowicz-Piasecka, M., Sikora, J., Szydłowska, A., Skupień, A., Mikiciuk-Olasik, E., et al. (2017) Metformin — a future therapy for neurodegenerative diseases, *Pharm. Res.*, **34**, 2614-2627, doi: 10.1007/s11095-017-2199-y.
4. Chistyakov, D. V., Astakhova, A. A., and Sergeeva, M. G. (2018) Resolution of inflammation and mood disorders, *Exp. Mol. Pathol.*, **105**, 190-201, doi: 10.1016/j.yexmp.2018.08.002.
5. Chistyakov, D. V., Goriainov, S. V., Astakhova, A. A., and Sergeeva, M. G. (2021) High glucose shifts the oxylipin profiles in the astrocytes towards pro-inflammatory states, *Metabolites*, **11**, 311, doi: 10.3390/metabo11050311.
6. Kim, S. A., and Choi, H. C. (2012) Metformin inhibits its inflammatory response via AMPK-PTEN pathway in vascular smooth muscle cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **425**, 866-872.
7. Jing, Y., Wu, F., Li, D., Yang, L., Li, Q., and Li, R. (2018) Metformin improves obesity-associated inflammation by altering macrophages polarization, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **461**, 256-264.
8. Qi, T., Chen, Y., Li, H., Pei, Y., Woo, S. L., et al. (2017) A role for PFKFB3/iPKF2 in metformin suppression of adipocyte inflammatory responses, *J. Mol. Endocrinol.*, **59**, 49-59.
9. Zhou, J., Massey, S., Story, D., and Li, L. (2018) Metformin: An old drug with new applications, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 2863, doi: 10.3390/ijms19102863.
10. Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., et al. (2021) Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions, *Nat. Neurosci.*, **24**, 312-325.
11. Linnerbauer, M., Wheeler, M. A., and Quintana, F. J. (2020) Astrocyte crosstalk in CNS inflammation, *Neuron*, **108**, 608-622.
12. Lalo, U., and Pankratov, Y. (2021) Astrocytes as per-

- spective targets of exercise- and caloric restriction-mimetics, *Neurochem. Res.*, **46**, 2746-2759.
13. Bélanger, M., Allaman, I., and Magistretti, P. J. (2011) Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation, *Cell Metab.*, **14**, 724-738.
 14. Rotermund, C., Machetanz, G., and Fitzgerald, J. C. (2018) The therapeutic potential of metformin in neurodegenerative diseases, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **9**, 400, doi: 10.3389/fendo.2018.00400.
 15. Li, W., Chaudhari, K., Shetty, R., Winters, A., Gao, X., et al. (2019) Metformin alters locomotor and cognitive function and brain metabolism in normoglycemic mice, *Aging Dis.*, **10**, 949-963.
 16. Ge, A., Wang, S., Miao, B., and Yan, M. (2018) Effects of metformin on the expression of AMPK and STAT3 in the spinal dorsal horn of rats with neuropathic pain, *Mol. Med. Rep.*, **17**, 5229-5237.
 17. Ou, Z., Kong, X., Sun, X., He, X., Zhang, L., et al. (2018) Metformin treatment prevents amyloid plaque deposition and memory impairment in APP/PS1 mice, *Brain. Behav. Immun.*, **69**, 351-363.
 18. Wang, G., Cui, W., Chen, S., Shao, Z., Li, Y., et al. (2021) Metformin alleviates high glucose-induced ER stress and inflammation by inhibiting the interaction between caveolin1 and AMPK α in rat astrocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **534**, 908-913.
 19. Hohnholt, M. C., Blumrich, E. M., Waagepetersen, H. S., and Dringen, R. (2017) The antidiabetic drug metformin decreases mitochondrial respiration and tricarboxylic acid cycle activity in cultured primary rat astrocytes, *J. Neurosci. Res.*, **95**, 2307-2320.
 20. Westhaus, A., Blumrich, E. M., and Dringen, R. (2017) The antidiabetic drug metformin stimulates glycolytic lactate production in cultured primary rat astrocytes, *Neurochem. Res.*, **42**, 294-305.
 21. Astakhova, A., Chistyakov, D., Thomas, D., Geisslinger, G., Brüne, B., et al. (2019) Inhibitors of oxidative phosphorylation modulate astrocyte inflammatory responses through AMPK-dependent Ptg2 mRNA stabilization, *Cells*, **8**, 1185.
 22. Chistyakov, D. V., Azbukina, N. V., Astakhova, A. A., Polozhintsev, A. I., Sergeeva, M. G., et al. (2019) Toll-like receptors control p38 and JNK MAPK signaling pathways in rat astrocytes differently, when cultured in normal or high glucose concentrations, *Neurochem. Int.*, **131**, 104513, doi: 10.1016/j.neuint.2019.104513.
 23. Chistyakov, D. V., Gavrish, G. E., Goriainov, S. V., Chistyakov, V. V., Astakhova, A. A., et al. (2020) Oxylipin profiles as functional characteristics of acute inflammatory responses in astrocytes pre-treated with IL-4, IL-10, or LPS, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1780.
 24. Chistyakov, D. V., Aleshin, S. E., Astakhova, A. A., Sergeeva, M. G., and Reiser, G. (2015) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) α and γ of rat brain astrocytes in the course of activation by toll-like receptor agonists, *J. Neurochem.*, **134**, 113-124.
 25. Guryleva, M. V., Chistyakov, D. V., Lopachev, A. V., Goriainov, S. V., Astakhova, A. A., et al. (2021) Modulation of the primary astrocyte-enriched cultures' oxylipin profiles reduces neurotoxicity, *Metabolites*, **11**, 498, doi: 10.3390/metabo11080498.
 26. Gong, P., Xu, X., Shi, J., Ni, L., Huang, Q., et al. (2013) Phosphorylation of mitogen- and stress-activated protein kinase-1 in astrocytic inflammation: A possible role in inhibiting production of inflammatory cytokines, *PLoS One*, **8**, e81747, doi: 10.1371/journal.pone.0081747.
 27. Liu, X., Tian, Y., Lu, N., Gin, T., Cheng, C. H. K., et al. (2013) Stat3 inhibition attenuates mechanical allodynia through transcriptional regulation of chemokine expression in spinal astrocytes, *PLoS One*, **8**, e75804, doi: 10.1371/journal.pone.0075804.
 28. Kim, J., Kwak, H. J., Cha, J. Y., Jeong, Y. S., Rhee, S. D., et al. (2014) Metformin suppresses lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response in murine macrophages via Activating Transcription Factor-3 (ATF-3) induction, *J. Biol. Chem.*, **289**, 23246-23255.
 29. Li, W., Choudhury, G. R., Winters, A., Prah, J., Lin, W., et al. (2018) Hyperglycemia alters astrocyte metabolism and inhibits astrocyte proliferation, *Aging Dis.*, **9**, 674-684.
 30. Quincozes-Santos, A., Bobermin, L. D., de Assis, A. M., Gonçalves, C. A., and Souza, D. O. (2017) Fluctuations in glucose levels induce glial toxicity with glutamatergic, oxidative and inflammatory implications, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1863**, 1-14.
 31. Wang, J., Li, G., Wang, Z., Zhang, X., Yao, L., et al. (2012) High glucose-induced expression of inflammatory cytokines and reactive oxygen species in cultured astrocytes, *Neuroscience*, **202**, 58-68.
 32. Xian, H., Liu, Y., Rundberg Nilsson, A., Gatchalian, R., Crother, T. R., et al. (2021) Metformin inhibition of mitochondrial ATP and DNA synthesis abrogates NLRP3 inflammasome activation and pulmonary inflammation, *Immunity*, **54**, 1463-1477.e11.
 33. Tayara, K., Espinosa-Oliva, A. M., García-Domínguez, I., Ismaiel, A. A., Boza-Serrano, A., et al. (2018) Divergent effects of metformin on an inflammatory model of Parkinson's disease, *Front. Cell. Neurosci.*, **12**.
 34. Beurel, E., and Jope, R. S. (2009) Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain, *J. Neuroinflamm.*, **6**, 9, doi: 10.1186/1742-2094-6-9.
 35. Lamichhane, S., Bastola, T., Pariyar, R., Lee, E. S., Lee, H. S., et al. (2017) ROS production and ERK activity are involved in the effects of D- β -hydroxybutyrate and metformin in a glucose deficient condition, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 674, doi: 10.3390/ijms18030674.
 36. De Morais, H., de Souza, C. P., da Silva, L. M., Ferreira, D. M., Baggio, C. H., et al. (2016) Anandamide reverses depressive-like behavior, neurochemical abnormalities and oxidative-stress parameters in streptozotocin-diabetic rats: role of CB1 receptors, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **26**, 1590-1600.

37. Cui, N., Feng, X., Zhao, Z., Zhang, J., Xu, Y., et al. (2017) Restored plasma anandamide and endometrial expression of fatty acid amide hydrolase in women with polycystic ovary syndrome by the combination use of Diane-35 and metformin, *Clin. Ther.*, **39**, 751-758.
38. Quan, Y., Jiang, C. T., Xue, B., Zhu, S. G., and Wang, X. (2011) High glucose stimulates TNF α and MCP-1 expression in rat microglia via ROS and NF- κ B pathways, *Acta Pharmacol. Sin.*, **32**, 188-193.
39. Qiu, Z., He, Y., Ming, H., Lei, S., Leng, Y., et al. (2019) Lipopolysaccharide (LPS) aggravates high glucose- and hypoxia/reoxygenation-induced injury through activating ROS-Dependent NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in H9C2 cardiomyocytes, *J. Diabetes Res.*, **2019**, 8151836, doi: 10.1155/2019/8151836.
40. Kajiwar, C., Kusaka, Y., Kimura, S., Yamaguchi, T., Nanjo, Y., et al. (2018) Metformin mediates protection against legionella pneumonia through activation of AMPK and mitochondrial reactive oxygen species, *J. Immunol.*, **200**, 623-631.
41. Barros, L. F., Ruminot, I., San Martín, A., Lerchundi, R., Fernández-Moncada, I., et al. (2021) Aerobic glycolysis in the brain: Warburg and Crabtree Contra Pasteur, *Neurochem. Res.*, **46**, 15-22.
42. Zhang, J., Zhang, L., Nie, J., Lin, Y., Li, Y., et al. (2021). Calcineurin inactivation inhibits pyruvate dehydrogenase complex activity and induces the Warburg effect, *Oncogene*, **40**, 6692-6702.
43. Alhourani, A. H., Tidwell, T. R., Bokil, A. A., Røslund, G. V., Tronstad, K. J., et al. (2021). Metformin treatment response is dependent on glucose growth conditions and metabolic phenotype in colorectal cancer cells, *Sci. Rep.*, **11**, 1-10.
44. Frauwirth, K. A., Riley, J. L., Harris, M. H., Parry, R. V., Rathmell, J. C., et al. (2002). The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism, *Immunity*, **16**, 769-777, doi: 10.1016/s1074-7613(02)00323-0.
45. Mason, S. (2017). Lactate shuttles in neuroenergetics-homeostasis, allostasis and beyond, *Front. Neurosci.*, **11**, 43, doi: 10.3389/fnins.2017.00043.

ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF METFORMIN DURING CULTIVATION OF PRIMARY RAT ASTROCYTES IN A MEDIUM WITH HIGH GLUCOSE CONCENTRATION

V. O. Gorbatenko¹, S. V. Goriainov², V. A. Babenko³,
E. Yu. Plotnikov³, M. G. Sergeeva³, and D. V. Chistyakov^{3*}

¹ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia

² Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University),
117198 Moscow, Russia

³ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119992 Moscow, Russia; e-mail chistyakov@gmail.com

Investigation of the relationship between inflammation and energy metabolism is important for understanding the biology of chronic noncommunicable diseases. The use of metformin, a drug for the treatment of diabetes, is considered as a promising direction for the treatment of neurodegenerative diseases and other neuropathology's with an inflammatory component. Astrocytes play an important role in the regulation of energy metabolism and neuroinflammation; therefore, we studied the effect of metformin on the cellular responses of primary rat astrocytes cultured in a medium with high glucose concentration (incubation for 48 h, 22.5 mM). Lipopolysaccharide (LPS) was used as an inflammatory stimulus. The effects of metformin were assessed by changes in the expression of proinflammatory cytokines and the synthesis of oxylipins, detected by ultra-high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Changes at the intracellular level were assessed by analyzing the phosphorylation of ERK kinase and the transcription factor STAT3, cyclooxygenase 1 and 2 (COX) oxylipin synthesis enzymes. It was found that, regardless of glucose concentration, metformin reduces the LPS-stimulated release of cytokines IL-1 β and IL-6, the activity of the transcription factor STAT3, ERK kinase, the synthesis of derivatives of the cyclooxygenase branch of metabolism of oxylipins and anandamide, and did not affect the formation of ROS. The study of the energy phenotype of cells showed that metformin activated glycolysis and inhibited mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation, regardless of LPS stimulation and cell cultivation in high glucose concentration. Thus, it has been shown that metformin has anti-inflammatory effects, and its effect on the synthesis of cytokines, prostaglandins, and other lipid mediators can determine the beneficial effects of metformin in models of neuropathology.

Keywords: astrocytes, hyperglycemia, cytokines, oxylipins, STAT3, ERK, ROS, polyunsaturated fatty acids, anandamide, metformin

ПОМОГУТ ЛИ ПЕПТИДЫ ОСТАНОВИТЬ COVID-19?

Обзор

© 2022 В.Г. Круть¹, С.А. Чувпило¹, И.В. Астраханцева¹, Л.И. Козловская^{2,3},
Г.А. Ефимов⁴, А.А. Круглов^{5,6,7}, М.С. Друцкая^{1,8}, С.А. Недоспасов^{1,5,6,8*}

¹ АНО ВО Научно-технологический университет Сириус,
354340 Федеральная территория Сириус/Сочи, Россия; электронная почта: sergei.nedospasov@gmail.com

² ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», 108819 Москва, Россия

³ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова,
Институт трансляционной медицины и биотехнологий, 119991 Москва, Россия

⁴ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Минздрава России,
125167 Москва, Россия

⁵ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия

⁶ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия

⁷ Немецкий исследовательский центр ревматизма (DRFZ), Институт Лейбница, 10117 Берлин, Германия

⁸ Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 31.12.2021

После доработки 24.04.2022

Принята к публикации 11.05.2022

Пептиды широко применяются в диагностике, профилактике и терапии некоторых заболеваний человека. Насколько они могут быть полезны при болезни, вызываемой коронавирусом SARS-CoV-2? В настоящем обзоре мы обсуждаем возможность применения синтетических и рекомбинантных пептидов и полипептидов для профилактики COVID-19, основанной на блокировке взаимодействия вируса со своим главным рецептором — ACE2, а также использование синтетических пептидов в противовирусных вакцинах с учётом возникающих новых вариантов вируса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: SARS-CoV-2, ACE2, вакцина, Т-клеточные эпитопы.

DOI: 10.31857/S0320972522060021, **EDN:** ATTVXB

ВВЕДЕНИЕ

За последние двадцать лет β-коронавирусы (SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2) перестали быть патогенами животных и приобрели способность инфицировать человеческую популяцию. Все они вызывают респираторные заболевания, некоторые из которых характери-

зуются острым респираторным дистресс-синдромом, а также значительным повреждением лёгких, иногда приводящим к дыхательной недостаточности и смерти [1]. В декабре 2019 г. в г. Ухань, провинции Хубэй (Китай), были зарегистрированы первые случаи загадочной пневмонии неизвестной этиологии, которые привлекли внимание всего мира. Метагеномное секвенирование РНК от заболевших выявило новый вариант вируса из семейства Coronaviridae, который был обозначен как коронавирус «Wuhan-Hu-1» или «WH-Human 1», также он упоминается и как «2019-nCoV». Всей его последовательности генома был присвоен регистрационный номер — GenBank MN908947. Коронавирусы — это оболочечные вирусы, несущие геном в виде одноцепочеч-

Принятые сокращения: ACE2 — ангиотензин-превращающий фермент 2; Ang — ангиотензин; E — мембранный гликопротеин; FP — гидрофобный пептид слияния; HA — гемагглютинины; HR1 и HR2 — α-спиральные гидрофобные домены; M — матриксный белок; MHC — главный комплекс гистосовместимости; N — структурный белок нуклеокапсида; RAS — ренин-ангиотензиновая система; RBD — рецептор-связывающий домен; S — гликопротеин наружной мембраны.

* Адресат для корреспонденции.

Таблица 1. Характеристика «вариантов озабоченности» вируса SARS-CoV-2

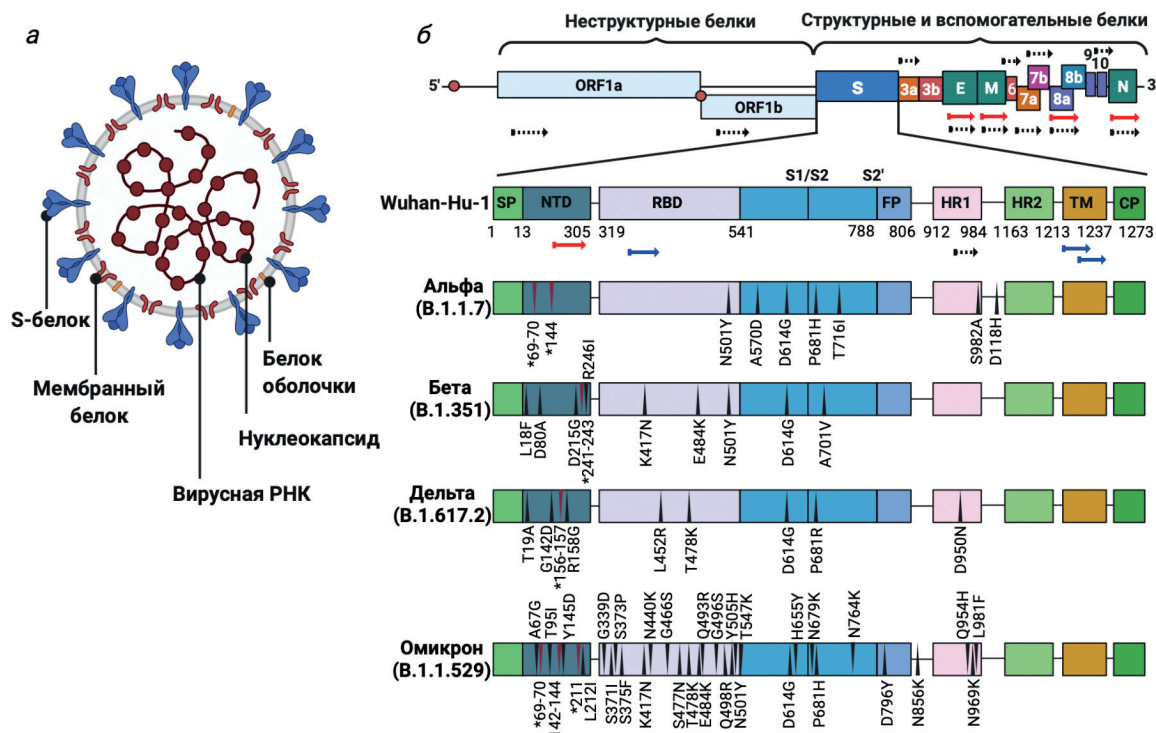
Вариант	Номер	Происхождение	Аминокислотные замены в S-белке	Аминокислотные делеции в S-белке
Альфа	B.1.1.7	Великобритания	N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H	H69/V70, Y144
Бета	B.1.351	Южная Африка	L18F, D80A, D215G, R246I, K417N, E484K, N501Y, D164G, A701V	L241, L242, A243
Дельта	B.1.617.2	Индия	T19R, G142D, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N	E156, F157
Омикрон	B.1.1.529	Южная Африка	A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	H69/V70, G142/V143/Y144, N211

ной РНК положительной полярности размером ~27–32 т.н. (размер генома SARS-CoV-2 — 29,9 т.н.), который кодирует структурные и неструктурные белки. Порядок генов в геноме вируса SARS-CoV-2 выглядит следующим образом: в 5'-концевых ORF1a/1b закодировано 16 неструктурных белков (nspl–16), функции части которых до сих пор неизвестны, но большинство участвует в репликации генома и регуляции ранней транскрипции. На 3'-концевых участках закодированы гены структурных белков: гликопротеина наружной мембраны (S), мембранного гликопротеина (Е), матриксного белка (М) и структурного белка нуклеокапсида (N), а также несколько малых неструктурных вспомогательных белков (рисунок, а и б). S-белок (от англ. — spike) встроен в мембрану вириона и формирует корону на поверхности вирусной частицы [2]. Этот белок опосредует прикрепление, слияние и проникновение вируса внутрь клетки и представляет собой одну из главных мишеней для выработки нейтрализующих антител в ответ на заболевание, разработки пептидных ингибиторов проникновения в клетки, биоинженерных антител и возможных вакцин для терапии [3]. Гомологичность последовательности генома SARS-CoV-2 с геномом вируса, который вызвал первую вспышку «атипичной пневмонии» у людей более двадцати лет назад (SARS-CoV), составляет 80%, при этом идентичность последовательности с геномом коронавируса летучих мышей (CoV RaTG13) составляет 96,2% [4]. Хотя S-белки обоих вирусов имеют очень высокую идентичность аминокислотной последовательности, S-белок SARS-CoV-2 имеет более высокое сродство к человеческому ангиотен-

зин-превращающему ферменту 2 (ACE2) по сравнению с вирусом Bat-CoV [5, 6]. Умеренная частота геномных мутаций SARS-CoV-2 оценивается в $1,25 \times 10^{-6}$ нуклеотидов за цикл репликации [7], поэтому регулярно появляются новые варианты SARS-CoV-2 с повышенной инфекционностью и способностью избегать иммунную защиту хозяина [8–10]. Некоторые мутации, возникшие в последовательности S-белка, увеличили сродство SARS-CoV-2 к клеточному рецептору ACE2, что, по-видимому, дало возможность новым вариантам вируса распространяться с очень высокой скоростью [11–19] (рисунок, б). Чтобы определить приоритетность мониторинга и исследования этих вариантов, ВОЗ разделила их на три категории, среди которых особенно выделяются «варианты озабоченности» (табл. 1).

Распространение вируса SARS-CoV-2 до недавнего времени не удавалось остановить, а ущерб от вызываемой им болезни, COVID-19, уже вызвал глобальные проблемы как в системах здравоохранения, так и в экономиках даже развитых стран [20]. В связи с отсутствием эффективных лекарств, специфичных конкретно к этому коронавирусу, центральную роль в сдерживании пандемии отводят профилактическим мерам, таким как массовая вакцинация, дистанцирование и ношение масок. Вакцинация необходима для создания нейтрализующих антител для защиты организма от инфекции SARS-CoV-2, а также для активации клеточного защитного ответа, в котором центральную роль играют Т-лимфоциты.

На сегодняшний день в борьбе с вирусом SARS-CoV-2 в мире участвуют 5 различных типов вакцин.



Схематическое изображение вируса SARS-CoV-2: а – структура вириона; б – строение S-белка вируса и местоположение мутаций у разных вариантов. Стрелками обозначено расположение кодирующих последовательностей для пептидов, выбранных для разработки вакцины с преимущественным Т-клеточным ответом [30] – черные стрелки с пунктиром; для вакцины CoVac-1 [31] – красные стрелки; для вакцины ЭпиВакКорона [32, 33] – синие стрелки

1. Цельновирионные вакцины, в которых используется химически инактивированный вирус SARS-CoV-2, не способный к репликации [21]. Хотя аттенуация живого вируса является классическим подходом к разработке эффективных вакцин, для вируса SARS-CoV-2 об аттенуированных живых вакцинах пока не сообщалось. Живые аттенуированные вакцины, как правило, сопряжены с риском реверсии, что делает этот подход неблагоприятным для высокопатогенных вирусов. С другой стороны, химическая инактивация может не вызывать полноценной защитной реакции, как в случае с вирусом Эбола, или приводить к нежелательным эффектам, которые наблюдались для инактивированного формалином респираторно-синцитиального вируса в 1960-х гг. [22].

2. Вакцины на основе модифицированной мРНК, упакованной в липидные частицы, разработаны для эффективной доставки матрицы для синтеза S-белка в клетку, что ведёт к индукции мощного иммунного ответа [23]. Данный тип вакцин изучается и применяется уже на протяжении десятилетий, в основном для иммунотерапии опухолей. Такие инновационные вакцины могут быть адаптированы для конкретного

инфекционного агента и произведены в больших количествах быстрее, чем при использовании других технологий.

3. Векторные вакцины, суть которых заключается в использовании рекомбинантных вирусов для доставки гена S-белка в клетку [24, 25]. Аденовирусные векторы являются наиболее изученными, поэтому они в основном и используются для создания вакцин против различных инфекционных заболеваний.

4. Белковые вакцины против SARS-CoV-2 с использованием рекомбинантного S-белка, полученного в разных системах экспрессии [26, 27]. При этом экспрессируемая полноразмерная форма S-белка может содержать замены в сайте расщепления фурином [28].

5. Наиболее близкие к теме настоящего обзора пептидные вакцины, в которых синтетические пептиды, соответствующие выбранным участкам вирусных белков, используются в различных форматах для индукции защитного иммунного ответа [29]. Сюда относятся как вакцины, индуцирующие защитные антитела, так и вакцины, направленные на активацию Т-клеточного ответа [30–33].

Различные платформы для создания вакцин позволяют достигать разных вариантов гуморальной и клеточной защиты. Пандемия показала, что решающее значение имеют инновационные вакцинные технологии, которые могут быть быстро адаптированы к конкретному вирусу и позволяют в кратчайшие сроки перейти к крупномасштабному производству.

МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИРУСА SARS-CoV-2 С КЛЕТКОЙ

S-белок вирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2 представляет собой сильно гликозилированный [34] трансмембранный белок слияния I-го типа размером примерно 180–200 кДа с N-концом, расположенным на внешней поверхности вируса, и коротким C-концом во внутримембранном пространстве [35]. В качестве рецептора для входа в клетку этот белок использует заякоренный на мембране ангиотензин-превращающий фермент 2 [36–38], а клеточные сериновые протеазы TMPRSS2 и катепсин L — для инициации перестроек своей структуры [39–40]. Рецептор ACE2 представляет собой трансмембранный фермент-гликопротеин I-го типа, который функционирует как монокарбоксипептидаза. Его основная физиологическая функция заключается в преобразовании биологически активного сосудосуживающего и воспалительного пептида ангиотензина-2 (Ang2) (8 аминокислотных остатков) в ангиотензин путём отщепления C-концевой аминокислоты [41]. ACE2 экспрессируется во многих органах и типах клеток, но особенно высокая экспрессия была отмечена в эпителиальных клетках альвеол лёгких и энтероцитах кишечника [42] — двух важных участках воздействия SARS-CoV-2. Более того, большинство клеток лёгких, экспрессирующих ACE2, представляют собой клетки альвеолярного эпителия типа II, которые более уязвимы для вирусной инфекции из-за высокой экспрессии генов, связанных с вирусной репликацией [43]. В структуре S-белка различают S1- и S2-субъединицы, которые имеют 2 сайта расщепления: многоосновный фуриновый сайт — S1/S2, а также сайт в области S2-субъединицы — S2' [44, 45]. Расщепление S1/S2 является необходимым условием для активации S-белка и последующего разрезания участка S2', оба события необходимы для инициации процесса слияния мембран при проникновении вируса в клетку.

Проникновение SARS-CoV-2 в клетки-мишени включает несколько этапов. Первоначальное расщепление вирусного S-белка происходит с помощью протеазы фуринов в многоосновном участке (RRAR) — S1/S2, этот процесс можно называть «затравкой», он приводит к образованию нековалентно связанных S1- и S2-субъединиц [46]. Протомеры S1/S2 после воздействия протеазы появляются на вирусной мембране в виде грибовидных тримеров. Каждый из протомеров, относящихся к рецептор-связывающим доменам (RBD), может принимать конформацию «открыто/вверх» или «закрыто/вниз» для связывания с рецептором [47]. Субъединица S1 опосредует начальное связывание с ACE2, тогда как область S2 содержит компоненты, необходимые для слияния мембран, состоящие из доменов гидрофобного пептида слияния (FP) и α -спиральных гидрофобных доменов гептад-1 (HR1) и гептад-2 (HR2), которые объединяются во время связывания с рецептором, формируя структуру в форме свернутой спирали [48]. После связывания RBD S1-субъединицы с ACE2-рецептором в присутствии TMPRSS2 на поверхности клетки происходит расщепление S2'-сайта. Расщепление сайта S2' открывает пептид слияния — FP [49], а диссоциация S1 от S2 вызывает резкие конформационные изменения в субъединице S2, особенно в HR1, продвигая пептид слияния ближе к мембране. Пара гептадных доменов создаёт α -спиральный антипараллельный комплекс между HR1 и HR2, который сближает вирусную и клеточную мембраны [50, 51]. Эта конформация очень устойчива и, как считается, помогает преодолеть большой энергетический барьер, связанный со слиянием мембран [52]. Само слияние мембран инициируется, когда гидрофобные остатки FP инкорпорируются в мембрану клетки-хозяина [53]. Впоследствии участки HR1 и HR2 тримерного вирусного трансмембранного белка взаимодействуют с образованием пучка из шести спиралей, который стягивает вирусную и клеточную мембраны вместе для образования поры слияния, через которую вирусная РНК высвобождается в цитоплазму клетки-мишени для дальнейшего удаления нуклеокапсида и начала цикла репликации. Если клетка-мишень экспрессирует недостаточное количество TMPRSS2 или если комплекс вирус–ACE2 не встречается с TMPRSS2, то такой комплекс интернализуется внутрь клетки посредством эндоцитоза, опосредованного клатрином, в

эндолизосомы, где расщепление S2'-участка осуществляется катепсинами, которым для активности требуется кислая среда. Далее по вышеописанному механизму с помощью пептида слияния образуется пора, после чего вирусная РНК доставляется в цитоплазму и начинается цикл репликации.

Все эти этапы — расщепление S1/S2 и S2', прикрепление к клеточным рецепторам, конформационные изменения S1 и S2, экспонирование FP — имеют решающее значение для инфекции SARS-CoV-2 и могут рассматриваться как мишени для ингибиторов.

Строение SARS-CoV и SARS-CoV-2 практически идентично, поэтому предполагалось, что механизмы их проникновения аналогичны, но при этом молекулярное моделирование выявило более сильное взаимодействие RBD SARS-CoV-2 с рецептором ACE2. В частности, характерная петля с гибкими остатками глицина в структуре S-белка SARS-CoV-2 в случае SARS-CoV содержит жёсткие остатки пролина и отличается по структуре соответствующего домена. Фенилаланин — F486, расположенный в гибкой петле, вероятно, играет главную роль во взаимодействии с рецептором [54]. Ещё примечательно, что домены HR2 SARS-CoV-2 и SARS-CoV идентичны, в то время как домены HR1 демонстрируют вариабельность [55]. Возможно, это влияет на взаимодействие между HR1 и HR2, и, следовательно, может объяснить улучшенную способность SARS-CoV-2 к слиянию с плазматической мембраной [56].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ТЕРАПИИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Поиск и идентификация функциональных доменов в белковых компонентах возбудителей инфекций служат основой для возможного использования пептидов, так как эти домены можно имитировать с помощью коротких цепей аминокислот. Процедура подбора аминокислотной последовательности пептидов для синтеза представляет собой сложный процесс, включающий различные варианты анализа экспериментальных данных. Традиционно используются вычислительные методы и биоинформатические ресурсы, для которых в настоящее время есть большое количество удобных платформ. Например, платформа NHLBI-Ab Designer позволяет визуализировать инфор-

мацию, необходимую для выбора оптимальных последовательностей для производства пептидно-направленных антител. Базы данных UniprotKB/Swiss-Prot, PDB, PDBComplex, ORION, SPARKS-X и PEPstrMOD, с помощью которых можно получить информацию о структуре, функциях и свойствах белков, также помогают выбрать аминокислотные последовательности для синтеза. Для определения сайта связывания между белком и его рецептором используют данные рентгеноструктурного анализа, который помимо данных о структуре может помочь и в оптимизации связывания с белковой мишенью [57]. Ещё одним вариантом для поиска и отбора пептидов является технология фагового дисплея, которая позволяет выбирать высокоаффинные пептиды, связывающие мишень, из пула сложных смесей с использованием фаговых комбинаторных библиотек. Поскольку пептиды отображены на поверхности нитевидного бактериофага, можно провести отбор тех из них, которые обладают наибольшим сродством к мишени [58, 59].

Технологии химического синтеза и очистки пептидов хорошо отработаны, однако их стоимость превышает таковую для многих вариантов, использующих рекомбинантную ДНК. Нарботка целевого полипептида с помощью бактериальной или эукариотической культур может быть чревата загрязнением продуктами жизнедеятельности клеток. Пептиды обладают рядом свойств, которые делают их ценными в качестве терапевтических средств: высокая специфичность, низкая токсичность, невысокая иммуногенность и долгосрочная стабильность при хранении [60].

Одним из важных факторов, влияющих на функциональность пептидов является их трёхмерная структура. При синтезе коротких пептидных последовательностей велик риск потери или нарушения третичной структуры соответствующего домена белка-мишени, что может привести к утрате активности. Кроме того, линейные немодифицированные пептиды обладают низкой устойчивостью в кровотоке — их быстро расщепляют протеазы сыворотки крови. Способ обойти такую деградацию — включение в аминокислотную последовательность неприродных D-аминокислот, которые более устойчивы к протеазному воздействию. Поиск терапевтических пептидов, изготовленных из D-аминокислот, является сложной задачей, для решения которой используют технологию зеркального фаго-

вого дисплея, при которой D-аминокислотная версия целевого белка подвергается скринингу против библиотеки на фаге с L-аминокислотами. Несмотря на сложности в синтезе D-аминокислотных белков, была разработана платформа для скрининга пептидов, устойчивых к протеазной активности, против крупных сложных белковых мишеней, таких как вирусные гликопротеины [61]. Для этого на основе вируса везикулярного стоматита была получена вирусная частица, псевдотипированная гликопротеином заирского штамма вируса Эбола (rVSV-ZEBOV). Сохранение третичной структуры гликопротеина в этой системе позволило существенно упростить анализ, в результате чего было установлено, что кателицидиновый антимикробный пептид LL-37 человека (LLGD FFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRT ES) может подавлять инфекцию рекомбинантным вирусом, предотвращая проникновение внутрь клетки. Ещё один вариант повышения активности пептидов — их конъюгация с холестерином, что повышает противовирусную активность, направляя ингибитор на липидные участки взаимодействия вирусов и клеток, где и происходит слияние [62]. В литературе описаны 3 пептида, конъюгированных с холестерином, активно противодействующие заражению вирусом Эбола: EBOV-5 (DWTKNIKDKIDKI IHDFVDKTLPDQS-C (PEG4-Chol)), EBOV-6 (DWTKNIKDKIDKIIHDFVDKTLPDQS-C (PEG12-Chol)) и EBOV-7 (IEPH DWTKNIKDKIDKIIHDFVDKTLPDQS-C (PEG12-Chol)). Их эффективность была доказана в системе *in vitro* и при тестировании летальных доз вирусной нагрузки в мышинной модели. Подобные пептиды представляют собой перспективные средства для специфичной терапии [63].

Для борьбы с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) были разработаны пептиды, называемые ингибиторами слияния или входа. Проникновение ВИЧ-1 и SARS-CoV-2 в клетку хозяина имеет ряд общих черт. Инфекция ВИЧ-1 тоже требует слияния вирусной и клеточной мембран, которое опосредуется гликопротеинами вирусной оболочки — gp120 и gp41. Сначала происходит связывание поверхностной субъединицы gp120 с клеточным рецептором CD4 и корецепторами CCR5 или CXCR4, что запускает каскад конформационных изменений, активирующих фузогенную функцию белка gp41. Пептид слияния на N-конце gp41 встраивается в клеточную мембрану, затем мембраны вируса и клетки-мишени соединя-

ются с образованием поры [64]. Синтетический пептид T20 (также известный как Энфувиртид или Фузеон), содержащий 36 аминокислот (YT SLIHSLEESQNQQEKNEQELLELDKWASL WNWF), что соответствует а.о. 638–673 gp41, одобрен для лечения ВИЧ-1 [65] и является первым из класса антиретровирусных препаратов, используемых в комбинированной терапии для лечения инфекции. Клиническое применение пептида T20 против ВИЧ-инфекции продемонстрировало, что пептидные противовирусные препараты могут быть безопасной и эффективной альтернативой при лечении инфекционных заболеваний.

Существующие в настоящее время способы лекарственной терапии гриппа основаны на воздействии на два вирусных белка — M2 и нейраминидазу N. Оба эти белка важны для обеспечения нормального жизненного цикла вируса. Однако мутации вируса гриппа и особенности его многокомпонентного генома приводят к появлению резистентных вариантов, против которых существующие противовирусные препараты оказываются малоэффективными. Эти обстоятельства указывают на необходимость разработки новых способов борьбы с этой вирусной инфекцией. Предполагается, что более эффективными могут оказаться стратегии, опирающиеся на применение препаратов, молекулярной мишенью которых будут белки-гемагглютинины (НА). Инфицирование вирусом гриппа начинается с того, что НА вируса, представляющие собой гликопротеины, взаимодействуют с сиаловыми кислотами, входящими в состав рецептора на поверхности клетки-хозяина. После контакта с клеткой гемагглютинин изменяет своё пространственное строение, фактически внедряясь в клеточную мембрану, что, в свою очередь, обеспечивает проникновение вируса внутрь клетки, где он начинает свой цикл репликации. Matsubara et al. [66] с помощью методики фагового дисплея идентифицировали НА-связывающий пентапептид (ARLPA), который взаимодействовал с рецептор-связывающим участком НА вируса и оказывал ингибирующее действие на инфекцию в клеточной культуре. Для того чтобы синтезированные пептиды были устойчивы к действию ферментов, они могут быть модифицированы с помощью остатков β-аланина и диаминовалеиновой кислоты (орнитина) — неприродных аминокислот. Циклическая структура синтезированных пептидов, отсутствие у них харак-

терных для линейных и разветвленных белковых молекул C- и N-концов также способствует устойчивости к гидролизу [67]. Отметим, что большинство обсуждаемых пептидных препаратов рассматриваются в первую очередь в качестве профилактических средств, так как они чаще всего нарушают ранние этапы инфекционного процесса [68].

ПРОФИЛАКТИКА И ТЕРАПИЯ ИНФЕКЦИИ SARS-CoV-2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ

Разработка специфичных ингибиторов ферментов (таких, как РНК-зависимая РНК-полимераза), критических для жизнедеятельности вируса, активно продолжается. Лекарства, ранее разработанные против других РНК-содержащих вирусов (вирусы гриппа, вирус лихорадки Эбола), пока дают скромные эффекты при лечении инфекции SARS-CoV-2. Отчасти поэтому в контексте новой коронавирусной инфекции особое внимание уделяется таким молекулярным мишеням, как RBD S-белка вируса, а также ACE2-рецептор и TMPRSS2-протеаза хозяина, как основным участникам стадий проникновения вируса в клетку. Есть надежда, как это произошло в случае ВИЧ-1, что эффективным лекарством окажется комбинация ингибиторов сразу двух или более мишеней.

S-белок. Противовирусными механизмами действия моноклональных антител (как профилактических, так и терапевтических) являются блокировка взаимодействия с клеточным рецептором ACE2 и предотвращение вирусного слияния с мембраной. Антитела, нацеленные на несколько эпитопов S-белка, особенно на его RBD, могут блокировать взаимодействие с ACE2 или предотвращать слияние мембран, так что этот механизм лежит в основе действия нейтрализующих антител и при лечении моноклональными антителами [69, 70]. Существует несколько вариантов моноклональных антител человека, которые ингибируют проникновение вируса путём блокировки взаимодействия вируса и рецептора. В качестве примера можно привести антитела anti-SARS-CoVAb – 80R и S230 [71, 72]. Подчеркнём, что антитела, искусственно введённые в организм, имеют ограниченное время жизни в организме реципиента, а формирования клеток иммунологической памяти такая терапия/профилактика не предполагает.

ACE2. В качестве одной из стратегий ингибирования взаимодействия вируса SARS-CoV-2 с клеткой может быть рассмотрен вариант блокировки рецептора ACE2. Действительно, быстрое мутирование вируса и появление его новых вариантов являются ограничивающими факторами при разработке лекарств, а структура ACE2 остаётся неизменной. С другой стороны, ACE2 имеет важные физиологические функции в организме, и его связывание с SARS-CoV-2 может снижать активность, нарушая баланс ACE/ACE2 в сторону увеличения активности ACE. Гены, кодирующие ACE и ACE2, схожи по своему строению, но в организме эти белки выполняют разные функции. Оба белка являются незаменимыми компонентами ренин-ангиотензиновой системы (RAS). С помощью ренина ангиотензиноген, синтезированный в печени, преобразуется в ангиотензин-1 (Ang1), а затем при участии ACE – в Ang2. Ang2 – это ключевое звено RAS, он связывается с ангиотензиновым рецептором типа I (AT1R). ACE2 выступает в качестве контррегулятора активности комплекса ACE–Ang2–AT1R, он гидролизует Ang2 в Ang1–7, который (через Mas-рецептор) может вызывать вазодилатацию, снижение артериального давления и индукцию апоптоза. Кроме того, ACE2 может взаимодействовать с Ang1, превращая его в Ang1–9, из которого возможен переход в Ang1–7 при участии ACE. При использовании ингибиторов ACE и рецептора ангиотензина можно восстановить баланс системы ACE/ACE2, однако это, в свою очередь, может усилить связывание вируса SARS-CoV-2 с ACE2 и стимулировать развитие заболевания. Увеличение активности ACE приводит к сужению лёгочных сосудов и воспалительному и окислительному повреждению органов, а это увеличивает риск острого повреждения лёгких и системного воспаления [73].

Если иммунная система не в состоянии справиться с SARS-CoV-2, то вирус активно проникает в клетку и реплицируется, а затем при выходе во внеклеточное пространство разрушает клетку-хозяина. Как следствие, метаболический путь ангиотензина не ингибируется. Это обстоятельство только усугубляет инфекционный процесс и развитие воспаления. Установлено, что трансгенные мыши, заражённые вирусом SARS-CoV, испытывают недостаток ACE2, у них повышается уровень Ang2 и развиваются тяжёлые заболевания ор-

ганов дыхания [74]. Отсутствие ACE2, обеспечивающего протективную функцию, ведёт к дисфункции RAS и острым патологическим респираторным состояниям. Интересно, что защитная функция ACE2 при острых поражениях лёгких наблюдается не только при инфицировании коронавирусом. У лабораторных мышей, имеющих массивный отёк лёгких, тяжёлую гипоксию и воспалительные клеточные инфильтраты, при введении рекомбинантного ACE2 наблюдалось восстановление лёгочной ткани.

Каноническая концепция лиганд-рецепторного взаимодействия предполагает специфичное связывание лиганда, обычно с высокой аффинностью, и дальнейшую передачу внутриклеточного сигнала через цитоплазматическую часть рецептора. Для многих классов рецепторов существуют природные рецепторы-приманки (decoy receptors), которые действуют как молекулярная ловушка для лиганда и как ингибитор сигнальных компонентов рецептора. Так, рецептор-приманка интерлейкина-1 типа II (IL-1RII) был первым примером такого ингибирования в иммунной системе [75, 76]. Впоследствии были идентифицированы рецепторы-приманки для представителей семейств рецепторов фактора некроза опухоли [77]. Очевидно, что растворимые рецепторы-приманки сами не способны передавать сигналы, но они снижают биодоступность лигандов (в частности, провоспалительных цитокинов) и уровни передаваемых ими молекулярных сигналов.

Подобная стратегия может быть применена и при разработке противовирусного пептидного лекарства на основе ACE2-рецептора. Так, рекомбинантная форма растворимого ACE2 (sACE2) была использована в качестве приманки, которая не нарушает физиологических функций ACE2, а только конкурирует за связывание с вирусным S-белком [78]. Даже с учётом мутаций вирус обладает ограниченным потенциалом избегать нейтрализации, опосредованной sACE2, без одновременного снижения сродства к мембранному рецептору ACE2, что сделало бы вирус менее вирулентным. Препарат на основе sACE2 в настоящее время проходит фазу II клинических испытаний [79], а параллельно несколько групп разработали свои варианты sACE2 для создания высокоаффинных приманок для SARS-CoV-2 [80–82]. Так, с помощью глубокого мутагенеза была отобрана растворимая форма ACE2, которая наиболее эффективно связывалась с S-белком. В результате был разработан растворимый рецеп-

тор-приманка — sACE2_{v2.4} (19–805 а.о.), имеющий 3 аминокислотные замены (T27Y, L79T, N330Y), который является димерным, моодисперсным, хорошо растворимым и стабильным. Этот вариант сопоставим по активности с нейтрализующими антителами и взаимодействует с S-белком как вируса SARS-CoV-2, так и SARS-CoV. Благодаря своей высокой активности и технологичности sACE2_{v2.4} является хорошим кандидатом для последующих доклинических и клинических испытаний. Рекомбинантные высокоаффинные рецепторы-приманки, несмотря на сходство с природным ACE2, могут нести дополнительные вариации на поверхности взаимодействия или вблизи неё. Таким образом, у шипов вируса есть возможность отличать искусственную приманку от рецептора дикого типа [83].

Какой минимальной длины должны быть фрагменты ACE2, чтобы эффективно конкурировать за связывание с S-белком? Этот важный вопрос был изучен в серии недавних исследований, но их результаты явно противоречивы. Одним из первых пептидов, сконструированных на основе структурного анализа связывания ACE2 с RBD вирусов SARS-CoV-2 и SARS-CoV был 23-членный пептид SBP1 (IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQS), использованный в работе Zhang et al. [84]. Этот пептид был создан на основе α 1-спирали ACE2 и показал связывание с RBD вируса SARS-CoV-2, однако данных о тестировании пептида в опытах по блокировке *in vitro* или *in vivo* представлено не было. Пептиды на основе α 1-спирали ACE2 использовались и Karoyan et al. [85] для создания немодифицированных пептидных имитаторов ACE2 с высокой спиральностью. Однако увеличение спиральности привело к повышению гидрофобности, что сказалось на растворимости пептида и отсутствии нейтрализующего эффекта против вируса. Аминокислотные замены лейцина на тирозин привели к небольшому снижению спиральности, при этом существенно повысили нейтрализующую активность против SARS-CoV-2 (100%-ная эффективность при добавлении 1 мкМ пептида P8, P9 и P10 при заражении культуры клеток Calu-3) [85].

Спиральные участки являются одним из основных вторичных структурных элементов в белок-белковом взаимодействии. Часто эти элементы конформационно нестабильны и чувствительны к протеолизу пептидазами. Для преодоления вышеуказанных ограничений мо-

жет быть проведена пептидная оптимизация, в частности, путём включения неприродных боковых цепей или других химических модификаций. Для усиления α -спиральной конформации в пептиде используют неприродные аминокислоты, которые лежат на одной и той же поверхности спирали. Эти неприродные аминокислоты затем соединяются вместе с помощью углеводородных боковых цепей или дисульфидных мостиков и могут быть ковалентно связаны. «Сшитые» (stapled) пептиды демонстрируют значительно улучшенную фармакологическую эффективность, повышенное сродство к мишеням и устойчивость к протеолитическому расщеплению. По сравнению с низкомолекулярными лекарственными средствами, которые часто продуцируют токсичные метаболиты, пептиды показывают лучшее связывание из-за их способности взаимодействовать с большими поверхностями белков с большей селективностью и меньшей токсичностью [86, 87]. Так, попытка химической стабилизации пептидов для поддержания их спиральной структуры была предпринята в работе Morgan et al. [88]. Для определения положения углеводной скобы они ориентировались на изгиб $\alpha 1$ -спирали ACE2 относительно положения гистидина — H34. Такие скобы были размещены по обе стороны гистидина, а также поперёк него. Было сконструировано несколько сшитых пептидов, среди которых пептид под номером 8 (IEEQAKTFLDKFNHER₈EDLFYQS₅) показал самый высокий уровень спиральности — 72%, но при этом даже он не блокировал проникновение вируса SARS-CoV-2 в опыте *in vitro*. Эта группа также использовала сшитые пептиды, одним из которых был пептид G-link (IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSS-G-LGKGDFR), который в работе других исследователей показывал нейтрализацию коронавируса SARS-CoV, но в работе Morgan et al. [88] защитного эффекта не детектировалось. Независимо, другая группа [89] разработала панель более длинных 26-членных сшитых пептидов на основе последовательности ACE2-рецептора. Три таких пептида показали заметную нейтрализацию *in vitro* в системе, в которой псевдовirus, несущие S-белок SARS-CoV-2 и люциферазную метку, взаимодействовали с клетками в культуре, на мембране которых был сверхэкспрессирован рецептор ACE2. Функционируя в качестве приманки сайта связывания ACE2 с SARS-CoV-2, эти сшитые пептиды обладали блокирующим потенциалом [89]. Скрепление

структуры этих пептидов было выполнено с помощью ковалентной химической сшивки, благодаря чему была усилена стабильность α -спирали, повышена устойчивость к протеолитическому расщеплению и, таким образом, увеличивалась эффективность блокировки. Так, пептиды NYBSP-1 (TIEEQAKT-X-LDK-X-NHEAEDLFYQ-X-SLA-X-WN) и NYBSP-4 (TIEEQ-Z-KTFLDK-X-NHEAEDLFYQ-X-SLA-X-WN) продемонстрировали нейтрализующую активность против псевдовиральных частиц на 80–90% в зависимости от концентрации. Отметим, что нами были подтверждены результаты этой работы.

Кроме того, российской группой исследователей были сконструированы и изучены химерные пептиды X1 и X2 (табл. 2) на основе двух линейных пептидов h1 (IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYk) и h2 (DKWSAFLKEQSTIAQNleYPLQECl), в состав которых включены D-аминокислоты (в пептидной последовательности выделены жирным шрифтом). Линейные пептиды h1 и h2 соответствовали фрагментам 21–42 и 64–88 аминокислотных последовательностей спиралей $\alpha 1$ и $\alpha 2$ внеклеточного домена ACE2 соответственно. В их последовательности были сохранены неизменными большинство аминокислотных остатков, участвующих во взаимодействии с RBD, но молекулы X1 и X2 отличались друг от друга локализацией дисульфидных мостиков. Химерная молекула X1 представляла собой дисульфидный димер, в котором концевые остатки цистеина в молекулах-предшественниках h1 и h2 были соединены S–S-связью. В структуре молекулы X2 дисульфидные мостики располагались в середине каждого из пептидов-предшественников. Однако в системе *in vitro* с использованием клеток Vero и вируса SARS-CoV-2 ни один из этих пептидов не показал заметной нейтрализации вируса [90]. Нашей группой было проведено аналогичное исследование с использованием 32-членного синтетического пептида P1 (STIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSSLASWNY), полностью включающего ту же $\alpha 1$ -спираль, и 80-членного рекомбинантного пептида P2 (MSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSSLASWNYNTNITEENVQNMNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALQHHNNH), включающего обе спирали $\alpha 1$ и $\alpha 2$, а также их производных, основанных на анализе участков контакта домена ACE2, связывающего RBD S-белка [91]. Эти пептиды хорошо связывались с S-белком вируса в иммунофер-

ментном анализе, однако в опытах по нейтрализации, как в псевдовиральной системе, так и с живым вирусом SARS-CoV-2, не препятствовали проникновению вируса в клетки HEK293T/ACE2 и Vero, что согласуется с выводами работ Morgan et al. [88] и Bibilashvili et al. [90], но противоречит работе Curreli et al. [89].

Наконец, ещё одной группой [92] были синтезированы и изучены короткие пептидные ингибиторы, потенциально блокирующие взаимодействие S-белков коронавируса с рецептором ACE2. Выяснилось, что 17 из 20 а.о. в молекуле ACE2, контактирующих с RBD вирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2, совпадают. Было идентифицировано два пептида — SAP1 (27-TFLDKFNHEAEDLFYQ-42) и SAP6 (37-EDLFYQ-42), которые в опытах *in vitro* ингибировали проникновение вируса в клетки. Особенно интересным является пептид SAP6, который содержит минимальную консенсусную последовательность EDLFYQ — всего 6 аминокислот из N-концевой α 1-спирали ACE2 [92]. С учётом отрицательных данных по блокировке, независимо полученных разными группами (за исключением работы Curreli et al. [89]), эти результаты для таких коротких пептидов представляются сомнительными. Кроме того, были изучены небольшие анти-ACE2-пептиды, димеризация которых усиливала нейтрализующую активность против SARS-CoV-2, при этом из 26 разработанных пептидов значительная доля оказывала влияние на биологическую активность рекомбинантного ACE2 человека. Тем не менее пептид CPS4 (NNYLWWMTEYND) и его димер эффективно блокировали вход вируса в клетку, но при этом не влияли на функциональную активность ACE2 [93]. Отметим, что ни для одного из обсуждаемых пептидов не было представлено результатов по их активности *in vivo* (табл. 2).

TMPRSS2. Слияние вирусной и клеточных мембран обеспечивает сериновая протеаза TMPRSS2 — белок на клеточной поверхности, который экспрессируется в различных органах и тканях человека, включая дыхательные пути, предстательную железу и желудочно-кишечный тракт. Протеазная активность TMPRSS2 способствует активации вирусных гликопротеинов, прогрессированию рака предстательной железы и расщеплению эндогенных субстратов, среди которых можно выделить рецептор PAR-2, который модулирует воспалительные реакции, ожирение, метаболизм и рак. Ингибирование экспрессии TMPRSS2 приводит к

снижению эффективности проникновения вируса, хотя это также может привести к снижению расщепления эндогенных субстратов [94]. Для блокировки проникновения вируса в клетку можно ингибировать функции TMPRSS2, используя пептиды, содержащие аргинин [95] или гидрофобные аминокислоты (в частности, изолейцин) для блокирования гидрофобного кармана на S1-субъединице S-белка, который связывается с протеазой [96]. Важно отметить, что при генетическом нокауте *TMPRSS2* у мышей не наблюдается явных фенотипических отклонений, что делает эту модель удобной для доклинических исследований. Стратегия ингибирования протеазы TMPRSS2 уже была испытана против заражения клеток вирусом гриппа [97], при этом в системе *in vitro* были исследованы гидрофобные деканоилированные миметические пептидные ингибиторы. Так, был синтезирован конъюгированный с пептидом фосфородиамидатный морфолиновый олигомер (PPMO), действие которого приводило к экспрессии неполной и неактивной формы фермента TMPRSS2, что помогало избежать инфицирования клеток вирусом [97, 98].

ПЕПТИДНЫЕ ВАКЦИНЫ

Первая демонстрация того, что пептиды могут вызывать защитный иммунитет *in vivo* в дополнение к нейтрализующей активности *in vitro*, была получена в 1982 г. с использованием вируса ящура на животных [99], хотя эти разработки не получили дальнейшего применения в ветеринарии. Одной из первых была разработана пептидная вакцина для собак против собачьего парвовируса, который относится к семейству Parvoviridae и представляет собой небольшой непокрытый оболочкой одноцепочечный ДНК-вирус. Капсид этого вируса состоит из трёх разных белковых субъединиц (VP), которые именуют VP1, VP2 и VP3. Была идентифицирована последовательность из 37 аминокислот в N-концевом участке VP2, которая была идентична в пробах заражённых животных разных видов (коты, норки и еноты). На основании этой последовательности для иммунизации были выбраны 2 пептида: 1L15 (MSDGAVQPDGGQPAV) и 7L15 (QPDGGQPAVRNERAT), их конъюгировали с KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) и успешно иммунизировали собак [100]. После успеха такой вакцины продолжился поиск возможности

Таблица 2. Пептиды, нацеленные на блокировку взаимодействия S-белка вируса SARS-CoV-2 с клеточным рецептором ACE2

Название пептида	Аминокислотная последовательность	Происхождение	Возможное применение, комментарий	Оценка нейтрализующей активности вируса SARS-CoV-2	Ссылка
SBP1	IEEQAKTFLDKFNHEAE DLFYQS	N-концевой участок α 1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	<i>in vitro</i> нейтрализующая активность не проверена, взаимодействие с RBD вируса SARS-CoV-2 в искусственной системе было отмечено при концентрации 45 нМ	[84]
P8	SALEEQLKTFLDKFMHELEDL LYQLAL	N-концевой участок α 1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	высокая нейтрализующая <i>in vitro</i> активность (100%-ная эффективность при концентрации 1 мкМ)	[85]
P9	SALEEQYKTFLDKFMHELEDL LYQLSL	N-концевой участок α 1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	высокая нейтрализующая <i>in vitro</i> активность (100%-ная эффективность при концентрации 1 мкМ)	[85]
P10	SALEEQYKTFLDKFMHELEDL LYQLAL	N-концевой участок α 1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	высокая нейтрализующая <i>in vitro</i> активность (100%-ная эффективность при концентрации 1 мкМ)	[85]
8	IEEQAKTFLDKFNHER ₈ EDL FYQS ₅	N-концевой участок α 1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	отсутствие <i>in vitro</i> нейтрализующей активности (от 0,1 до 1 мМ)	[88]
G-link	IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFY QSS-G-LGKGDFR	N-концевой участок α 1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	отсутствие <i>in vitro</i> нейтрализующей активности (от 0,1 до 1 мМ)	[88]
G-link «сшитый»	IR ₈ EQAKTFS ₅ DKFNHEAEDLFY QSS-G-LGKGDFR	N-концевой участок α 1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	отсутствие <i>in vitro</i> нейтрализующей активности (от 0,1 до 1 мМ)	[88]
NYBSP-1	TIEEQAKT-X-LDK-X-NHE AEDLFYQ-X-SLA-X-WN	N-концевой участок α 1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	высокая нейтрализующая активность в псевдовиральной системе: $IC_{50} = 4,1 \pm 0,26$ мкМ	[89]
NYBSP-4	TIEEQ-Z-KTFLDK-X-NHE AEDLFYQ-X-SLA-X-WN	N-концевой участок α 1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	высокая нейтрализующая активность в псевдовиральной системе: $IC_{50} = 1,97 \pm 0,14$ мкМ	[89]

Окончание таблицы 2

Название пептида	Аминокислотная последовательность	Происхождение	Возможное применение, комментарий	Оценка нейтрализующей активности вируса SARS-CoV-2	Ссылка
X1	cEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYk S-S DKWSAFLKEQSTIAQ Ne YPLQE CI	две N-концевых α-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	взаимодействие с RBD вируса SARS-CoV-2 в искусственной системе (1–10 мкМ), отсутствие нейтрализующей активности <i>in vitro</i>	[90]
X2	IIEEQAKTFLDKFNHQAEDLFYk CO(CH ₂) ₂ S-S DKWSAFLKECSTIAQIYPLQEI	две N-концевых α-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	взаимодействие с RBD вируса SARS-CoV-2 в искусственной системе (1–10 мкМ), отсутствие нейтрализующей активности <i>in vitro</i>	[90]
P1	STIEEQAKTFLDKFNHEAEDL FYQSSLASWNY	N-концевая α1-спираль ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	взаимодействие с RBD вируса SARS-CoV-2 в искусственной системе (min 0,46 мкМ)	[91]
P2	MSTIEEQAKTFLDKFNHE AEDLFYQSSLASWNYNTNI TEENVQNMNNAGDKWSA FLKEQSTLAQMYPLQEIQNL VKLQLQALQHNNHHHH	две N-концевых α-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	взаимодействие с RBD вируса SARS-CoV-2 в искусственной системе (min 0,064 мкМ)	[91]
SAP1	TFLDKFNHEAEDLFYQ	N-концевой участок α1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	высокая нейтрализующая активность в псевдовиральной системе: IC ₅₀ = 2,39 ± 0,20 мМ	[92]
SAP6	EDLFYQ	N-концевой участок α1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	высокая нейтрализующая активность в псевдовиральной системе: IC ₅₀ = 1,90 ± 0,14 мМ	[92]
CPS4 димер	NNYLWWMTEYHD	ACE2-рецептор	анти-ACE2	блокировка SARS-CoV-2/RBD-ACE2-взаимодействия, IC ₅₀ = 31 нМ	[93]

Примечание: для пептидов 8 и G-link «сшитый» подстрочные цифры обозначают места химических стабилизаций спирали; X = S-2-(4-пентенил) аланин; Z = -(R)-2-(7-октенил) аланин; S–S – дисульфидная связь; для пептидов X1 и X2 модификации выделенные жирным шрифтом обозначают D-аминокислоты, участвующие в стабилизации пептида с помощью дисульфидной связи.

получения более иммуногенного пептида из N-концевого участка VP2, что привело к развитию применения пептидных вакцин в будущем, в том числе и в ветеринарии [101–103].

Abduljaleel et al. [30] было проведено исследование, в котором для разработки пептидной вакцины против SARS-CoV-2 на основе анти-

генных эпитопов вируса были выбраны последовательности 12 пептидов длиной не более 10–13 аминокислот:

- 1 – MDEFIERYKLEGY (ORF1ab),
- 2 – PYEDFQENWNTKH (ORF1a),
- 3 – LQDVVNQNAQALN (S-белок),
- 4 – YDYCIPYNSVTSS (ORF3a),

Таблица 3. Пептиды, входящие в состав профилактических вакцин против SARS-CoV-2

Название пептида	Аминокислотная последовательность	Происхождение (позиции в структуре вируса)	Возможное применение	Ссылка
P1_nuc	ASWFTALTQH GKEDL	домен структурного белка нуклеокапсида SARS-CoV-2 (50–64)	Т-клеточная пептидная вакцина	[31]
P2_nuc	LLLLDRLNQLESKMS	домен структурного белка нуклеокапсида SARS-CoV-2 (221–235)	Т-клеточная пептидная вакцина	[31]
P3_spi	ITRFQTL LALHRSYL	домен S-белка SARS-CoV-2 (235–249)	Т-клеточная пептидная вакцина	[31]
P4_env	FYVYSRVK NLN SSRV	домен белка оболочки SARS-CoV-2 (56–70)	Т-клеточная пептидная вакцина	[31]
P5_mem	LSYYKLGASQ RVAGD	домен мембранного белка SARS-CoV-2 (176–190)	Т-клеточная пептидная вакцина	[31]
P6_ORF8	SKWYIRVGARKSAPL	белок, кодируемый ORF8 вируса SARS-CoV-2 (43–57)	Т-клеточная пептидная вакцина	[31]
ЭпиВакКорона (пептид №1)	RLFRKSNLKP FERD-ISTEIQAGS	участок RBD S-белка (454–477)	пептидная вакцина	[32, 33]
ЭпиВакКорона (пептид №2)	KEIDRLNEVAKNL-NESLIDLQE	трансмембранный домен S-белка (1181–1211)	пептидная вакцина	[32, 33]
ЭпиВакКорона (пептид №3)	KNL NESLIDLQEL-GKYEQYIK	трансмембранный домен S-белка (1181–1211)	пептидная вакцина	[32, 33]

- 5 – YVYSRVK NLN SSR (Е-белок),
 6 – NGTITVEELKKLL (М-белок),
 7 – TENKYSQLDEEQP (ORF6),
 8 – SPKLFIRQEEVQE (ORF7a),
 9 – FSLELQDHNETCH (ORF7b),
 10 – FYEDFLEYHDVRV (ORF8),
 11 – DQELIRQGTDYKH (N-белок),
 12 – SRNYIAQVDVVNF (ORF10).

Каждый пептид был соединён линкером «GPGPG», чтобы обеспечить пространственное разделение эпитопов и облегчить иммунной системе процессинг антигенов. Пептидный адъювант был присоединен к N-концу конструкции с помощью линкера «EAAAK», чтобы усилить длительный иммунный ответ. Конечная конструкция состояла из ~156 аминокислот с молекулярной массой ~18,72 кДа.

Недавно были опубликованы результаты фазы I клинических испытаний перспективной пептидной вакцины против SARS-CoV-2, которая направлена на активацию Т-клеточного иммунитета [31]. Известно, что

Т-лимфоциты обладают частичной протективной функцией даже при отсутствии антител и предотвращают развитие тяжёлых форм заболевания [104]. При этом, в отличие от нейтрализующих антител, цитолитические Т-лимфоциты для выполнения своей эффекторной функции могут распознавать эпитопы из любых антигенов SARS-CoV-2, а не только из S-белка. В исследовании Heitmann et al. [31] здоровых добровольцев иммунизировали смесью из 6 линейных 15-членных пептидов: P1_nuc (ASWFTALTQH GKEDL), P2_nuc (LLLLDRLNQLESKMS), P3_spi (ITRFQTL LALHRSYL), P4_env (FYVYSRVK NLN SSRV), P5_mem (LSYYKLGASQ RVAGD), P6_ORF8 (SKWYIRVGARKSAPL), представляющих собой фрагменты структурных: S-, N-, М- и Е-белков, а также одного неструктурного белка – ORF8 (табл. 3). В качестве одного из компонентов адъюванта использовали 9-членный пептид с липидной модификацией на N-конце, который является мощным агонистом гетеродимерного рецептора врождённого имму-

нитета TLR1/TLR2 [105]. Изюминка работы состояла в выборе пептидов, основанном на предыдущих работах той же группы [106, 107], которые были подобраны таким образом, что внутри аминокислотных последовательностей, презентующихся молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II (DRB), содержались вложенные пептиды, презентующиеся частыми аллельными вариантами МНС класса I. Иммуный ответ со стороны Т-лимфоцитов был детектирован у всех участников клинического исследования. Кроме того, было показано, что он сохраняется на протяжении всего исследования (3 месяца) и по силе превосходит ответ, развивающийся в результате перенесённой инфекции.

Известно, что для получения хорошего иммунного ответа на пептиды у животных или человека полезно конъюгировать пептиды с белком-носителем, а также применять адъюванты. Так, разработчики отечественной пептидной вакцины использовали подобную стратегию на основе консервативных последовательностей S-белка SARS-CoV-2, что, предположительно, могло повысить устойчивость вакцины к возможным мутациям вируса (табл. 3). Были выбраны и химически синтезированы семь пептидов длиной 20–31 а.о., несущих предполагаемые линейные В-клеточные эпитопы S-белка. В качестве белка-носителя был выбран химерный рекомбинантный белок — MBP-6xHis-N_nCoV-2019, содержащий значительную часть N-белка вируса SARS-CoV-2 и белок MBP из *Escherichia coli*, являющийся продуктом экспрессии в прокариотической системе, а в качестве адъюванта использовали гидроксид алюминия. Далее для конъюгации были отобраны три наиболее иммуногенных пептида: RLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGS (соответствует участку рецептор-связывающего мотива S-белка вируса SARS-CoV-2), KEIDRLNEVAKNLNESLIDLQE и KNLNESLIDLQELGKYEQYIK (соответствуют участку трансмембранного домена S-белка). Эти три пептидо-белковых конъюгата, смешанные в соотношении 1/1/1 и адсорбированные на гидроксиде алюминия, и входят в состав вакцины ЭпиВакКорона [32, 33]. Отметим, что локализация В-клеточных эпитопов, определённых в независимых исследованиях [30], не совпадает с положением указанных пептидов. Данные о фазе III клинических испытаний этой вакцины пока не опубликованы, но в недавнем сравнительном исследовании эффективности отече-

ственных вакцин от варианта вируса Дельта эффективность ЭпиВакКороны была поставлена под сомнение [108].

В ряде работ были описаны и другие пептиды, представляющие собой иммуногенные Т-клеточные эпитопы [106, 109, 110]. Так, недавнее систематическое исследование иммуногенности панели пептидов, презентующихся с участием наиболее частых аллелей МНС, выявило несколько десятков эпитопов, ответ на которые после болезни или вакцинации развивается у большинства носителей конкретного аллельного варианта МНС [111]. Подобная панель пептидов может быть использована для определения Т-клеточного иммунного ответа у переболевших и вакцинированных и для анализа его стойкости. Интересно, что эти Т-клеточные эпитопы лишь минимально затронуты мутациями в распространённых вариантах вируса, так что на основе этих эпитопов разумно разрабатывать новые вакцины, направленные на индукцию Т-клеточного ответа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы рассмотрели возможное использование синтетических пептидов для борьбы с пандемией COVID-19. Большая часть предлагаемых стратегий относится к диагностике и профилактике инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2. Во-первых, это различные стратегии, направленные на блокировку входа вируса в клетку. Во-вторых, это использование пептидов при конструировании профилактических вакцин. Что касается блокировки входа вируса, мнение авторов состоит в том, что синтетические пептиды при всей их привлекательности (например, в составе профилактической ингаляционной формы) едва ли смогут конкурировать с моноклональными антителами и высокоаффинными растворимыми рецепторами-приманками. Синтез «сшитых» пептидов (табл. 2), которые способны блокировать вход вируса, исключительно дорог. Таким образом, едва ли COVID-19 будет побеждён с помощью таких пептидов. Что касается пептидных вакцин, то весьма высокой представляется вероятность успеха многообещающих Т-клеточных вакцин, которые находятся на ранних стадиях клинических испытаний. Хотя пока нет убедительной информации об эффективности пептидных В-клеточных вакцин, это направление также имеет перспективу.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке АНО ВО Научно-технологический университет Сириус (проект № ИМБ-НИР-2103), Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-60338) и Министерства науки и высшего образования (дополнительное соглашение № 075-03-2021-448/3, тема № 121122300151-5).

Благодарности. Авторы благодарят А.А. Ишмухаметова за поддержку и интерес к

работе, а также Р.А. Абагына, И.В. Ямпольского и Г.А. Малеева за полезные обсуждения.

Конфликт интересов. Л.И.К. — сотрудник организации ФГАНУ «ФНЦИРИП имени М.П. Чумакова РАН», которая является разработчиком и производителем вакцины против коронавирусной инфекции КовиВак.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит экспериментальных данных, полученных с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shereen, M. A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N., and Siddique, R. (2020) COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses, *J. Adv. Res.*, **24**, 91-98, doi: 10.1016/j.jare.2020.03.005.
- Wang, N., Shang, J., Jiang, S., and Du, L. (2020) Subunit vaccines against emerging pathogenic human coronaviruses, *Front. Microbiol.*, **11**, 298, doi: 10.3389/fmicb.2020.00298.
- Du, L., He, Y., Zhou, Y., Liu, S., Zheng, B. J., and Jiang, S. (2009) The spike protein of SARS-CoV — a target for vaccine and therapeutic development, *Nat. Rev. Microbiol.*, **7**, 226-236, doi: 10.1038/nrmicro2090.
- Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., et al. (2020) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin, *Nature*, **579**, 270-273, doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
- Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., et al. (2020) Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation, *Science*, **367**, 1260-1263, doi: 10.1126/science.abb2507.
- Ortega, J. T., Serrano, M. L., Pujol, F. H., and Rangel, H. R. (2020) Role of changes in SARS-CoV-2 spike protein in the interaction with the human ACE2 receptor: An *in silico* analysis, *EXCLI J.*, **19**, 410-417, doi: 10.17179/excli2020-1167.
- Amicone, M., Borges, V., Alves, M. J., Isidro, J., Zé-Zé, L., et al. (2021) Mutation rate of SARS-CoV-2 and emergence of mutators during experimental evolution, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.05.19.444774.
- Volz, E., Mishra, S., Chand, M., Barrett, J. C., Johnson, R., et al. (2021) Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England, *Nature*, **593**, 266-269, doi: 10.1038/s41586-021-03470-x.
- Wibmer, C. K., Ayres, F., Hermanus, T., Madzivhandila, M., Kgagudi, P., et al. (2021) SARS-CoV-2 501Y. V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma, *Nat. Med.*, **27**, 622-625, doi: 10.1038/s41591-021-01285-x.
- Tegally, H., Wilkinson, E., Giovanetti, M., Iranzadeh, A., Fonseca, V., et al. (2021) Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa, *Nature*, **592**, 438-443, doi: 10.1038/s41586-021-03402-9.
- Muik, A., Wallisch, A. K., Sängler, B., Swanson, K. A., Mühl, J., et al. (2021) Neutralization of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 pseudovirus by BNT162b2 vaccine-elicited human sera, *Science*, **371**, 1152-1153, doi: 10.1126/science.abg6105.
- Davies, N. G., Abbott, S., Barnard, R. C., Jarvis, C. I., Kucharski, A. J., et al. (2021) Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England, *Science*, **372**, doi: 10.1126/science.abg3055.
- Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., Xia, L., Guo, Y., and Zhou, Q. (2020) Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2, *Science*, **367**, 1444-1448, doi: 10.1126/science.abb2762.
- Belouzard, S., Chu, V. C., and Whittaker, G. R. (2009) Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 5871-5876, doi: 10.1073/pnas.0809524106.
- Barrett, C. T., Neal, H. E., Edmonds, K., Moncman, C. L., Thompson, R., et al. (2021) Effect of clinical isolate or cleavage site mutations in the SARS-CoV-2 spike protein on protein stability, cleavage, and cell-cell fusion, *J. Biol. Chem.*, **297**, 100902, doi: 10.1016/j.jbc.2021.100902.
- Singh, J., Rahman, S. A., Ehtesham, N. Z., Hira, S., and Hasnain, S. E. (2021) SARS-CoV-2 variants of concern are emerging in India, *Nat. Med.*, **27**, 1131-1133, doi: 10.1038/s41591-021-01397-4.
- Borisova, N. I., Kotov, I. A., Kolesnikov, A. A., Kaptelova, V. V., Speranskaya, A. S., et al. (2021) Monitoring the spread of the SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus) variants in the Moscow region using targeted high-throughput sequencing [in Russian], *Vopr. Virusol.*, **66**, 269-278, doi: 10.36233/0507-4088-72.

18. Kumar, S., Thambiraja, T. S., Karuppanan, K., and Subramaniam, G. (2021) Omicron and Delta variant of SARS-CoV-2: A comparative computational study of spike protein, *J. Med. Virol.*, doi: 10.1002/jmv.27526.
19. Gong, S. Y., Chatterjee, D., Richard, J., Prévost, J., Tauzin, A., et al. (2021) Contribution of single mutations to selected SARS-CoV-2 emerging variants spike antigenicity, *Virology*, **563**, 134-145, doi: 10.1016/j.virol.2021.09.001.
20. Jhun, H., Park, H. Y., Hisham, Y., Song, C. S., and Kim, S. (2021) SARS-CoV-2 Delta (B. 1.617.2) Variant: A unique T478K mutation in receptor binding motif (RBM) of spike gene, *Immune Netw.*, **21**, e32, doi: 10.4110/in.2021.21.e32.
21. Gao, Q., Bao, L., Mao, H., Wang, L., Xu, K., et al. (2020) Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2, *Science*, **369**, 77-81, doi: 10.1126/science.abc1932.
22. Rauch, S., Jasny, E., Schmidt, K. E., and Petsch, B. (2018) New vaccine technologies to combat outbreak situations, *Front. Immunol.*, **9**, 1963, doi: 10.3389/fimmu.2018.01963.
23. Corbett, K. S., Edwards, D. K., Leist, S. R., Abiona, O. M., Boyoglu-Barnum, S., et al. (2020) SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness, *Nature*, **586**, 567-571, doi: 10.1038/s41586-020-2622-0.
24. Folegatti, P. M., Ewer, K. J., Aley, P. K., Angus, B., Becker, S., et al. (2020) Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial, *Lancet*, **396**, 467-478, doi: 10.1016/s0140-6736(20)31604-4.
25. Logunov, D. Y., Dolzhikova, I. V., Shcheblyakov, D. V., Tukhvatulin, A. I., Zubkova, O. V., et al. (2021) Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia, *Lancet*, **397**, 671-681, doi: 10.1016/s0140-6736(21)00234-8.
26. Yang, J., Wang, W., Chen, Z., Lu, S., Yang, F., et al. (2020) A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity, *Nature*, **586**, 572-577, doi: 10.1038/s41586-020-2599-8.
27. Wang, J. (2021) New strategy for COVID-19 vaccination: targeting the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein, *Cell Mol. Immunol.*, **18**, 243-244, doi: 10.1038/s41423-020-00584-6.
28. Tian, J. H., Patel, N., Haupt, R., Zhou, H., Weston, S., et al. (2021) SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice, *Nat. Commun.*, **12**, 372, doi: 10.1038/s41467-020-20653-8.
29. Di Natale, C., La Manna, S., De Benedictis, I., Brandi, P., and Marasco, D. (2020) Perspectives in peptide-based vaccination strategies for syndrome coronavirus 2 pandemic, *Front. Pharmacol.*, **11**, 578382, doi: 10.3389/fphar.2020.578382.
30. Abduljaleel, Z., Al-Allaf, F. A., and Aziz, S. A. (2021) Peptides-based vaccine against SARS-nCoV-2 antigenic fragmented synthetic epitopes recognized by T cell and β -cell initiation of specific antibodies to fight the infection, *Biodes. Manuf.*, **4**, 490-505, doi: 10.1007/s42242-020-00114-3.
31. Heitmann, J. S., Bilich, T., Tandler, C., Nelde, A., Maringer, Y., et al. (2021) A COVID-19 peptide vaccine for the induction of SARS-CoV-2 T cell immunity, *Nature*, **601**, 617-622, doi: 10.1038/s41586-021-04232-5.
32. Ryzhikov, A. B., Ryzhikov, E. A., Bogryantseva, M. P., Danilenko, E. D., Imatdinov, I. R., et al. (2021) Immunogenicity and protectivity of the Peptide Vaccine against SARS-CoV-2, *Ann. Russ. Acad. Med. Sci.*, **76**, 5-19, doi: 10.15690/vramn1528.
33. Ryzhikov, A. B., Ryzhikov, E. A., Bogryantseva, M. P., Usova, S. V., Danilenko, E. D., et al. (2021) A single blind, placebo-controlled randomized study of the safety, reactogenicity and immunogenicity of the "EpiVacCorona" Vaccine for the prevention of COVID-19, in volunteers aged 18-60 years (phase I-II), *Russ. J. Infect. Immun.*, **11**, 283-296, doi: 10.15789/2220-7619-ASB-1699.
34. Watanabe, M., Omahdi, Z., and Yamasaki, S. (2020) Direct binding analysis between C-type lectins and glycans using immunoglobulin receptor fusion proteins, *Methods Mol. Biol.*, **2132**, 119-128, doi: 10.1007/978-1-0716-0430-4_12.
35. Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., et al. (2020) Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein, *Cell*, **181**, 281-292.e286, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
36. Tripet, B., Howard, M. W., Jobling, M., Holmes, R. K., Holmes, K. V., et al. (2004) Structural characterization of the SARS-coronavirus spike S fusion protein core, *J. Biol. Chem.*, **279**, 20836-20849, doi: 10.1074/jbc.M400759200.
37. Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., et al. (2003) Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus, *Nature*, **426**, 450-454, doi: 10.1038/nature02145.
38. Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., et al. (2020) Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 11727-11734, doi: 10.1073/pnas.2003138117.
39. Hussain, M., Jabeen, N., Amanullah, A., Baig, A. A., Aziz, B., et al. (2020) Structural basis of SARS-CoV-2 spike protein priming by TMPRSS2, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.04.21.052639.
40. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., et al. (2020) SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor, *Cell*, **181**, 271-280.e278, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
41. VanPatten, S., He, M., Altiti, A., Cheng, K. F., Ghanem, M. H., et al. (2020) Evidence supporting the use of peptides and peptidomimetics as potential

- SARS-CoV-2 (COVID-19) therapeutics, *Future Med. Chem.*, **12**, 1647-1656, doi: 10.4155/fmc-2020-0180.
42. Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M. L., Lely, A. T., Navis, G., et al. (2004) Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis, *J. Pathol.*, **203**, 631-637, doi: 10.1002/path.1570.
 43. Zhao, Y., Zhao, Z., Wang, Y., Zhou, Y., Ma, Y., et al. (2020) Single-cell RNA expression profiling of ACE2, the receptor of SARS-CoV-2, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **202**, 756-759, doi: 10.1164/rccm.202001-0179LE.
 44. Millet, J. K., and Whittaker, G. R. (2015) Host cell proteases: critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis, *Virus Res.*, **202**, 120-134, doi: 10.1016/j.virusres.2014.11.021.
 45. Shulla, A., Heald-Sargent, T., Subramanya, G., Zhao, J., Perlman, S., et al. (2011) A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry, *J. Virol.*, **85**, 873-882, doi: 10.1128/jvi.02062-10.
 46. Chambers, J. P., Yu, J., Valdes, J. J., and Arulanandam, B. P. (2020) SARS-CoV-2, early entry events, *J. Pathog.*, **2020**, 9238696, doi: 10.1155/2020/9238696.
 47. Gur, M., Taka, E., Yilmaz, S. Z., Kilinc, C., Aktas, U., et al. (2020) Conformational transition of SARS-CoV-2 spike glycoprotein between its closed and open states, *J. Chem. Phys.*, **153**, 075101, doi: 10.1063/5.0011141.
 48. Xu, C., Wang, Y., Liu, C., Zhang, C., Han, W., et al. (2021) Conformational dynamics of SARS-CoV-2 trimeric spike glycoprotein in complex with receptor ACE2 revealed by cryo-EM, *Sci. Adv.*, **7**, doi: 10.1126/sciadv.abe5575.
 49. Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., and Choe, H. (2022) Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **23**, 3-20, doi: 10.1038/s41580-021-00418-x.
 50. Tang, T., Bidon, M., Jaimes, J. A., Whittaker, G. R., and Daniel, S. (2020) Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development, *Antiviral Res.*, **178**, 104792, doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104792.
 51. Bosch, B. J., van der Zee, R., de Haan, C. A., and Rottier, P. J. (2003) The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex, *J. Virol.*, **77**, 8801-8811, doi: 10.1128/jvi.77.16.8801-8811.2003.
 52. White, J. M., Delos, S. E., Brecher, M., and Schornberg, K. (2008) Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **43**, 189-219, doi: 10.1080/10409230802058320.
 53. Millet, J. K., and Whittaker, G. R. (2018) Physiological and molecular triggers for SARS-CoV membrane fusion and entry into host cells, *Virology*, **517**, 3-8, doi: 10.1016/j.virol.2017.12.015.
 54. Chen, Y., Guo, Y., Pan, Y., and Zhao, Z. J. (2020) Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **525**, 135-140, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.02.071.
 55. Xia, S., Zhu, Y., Liu, M., Lan, Q., Xu, W., et al. (2020) Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein, *Cell. Mol. Immunol.*, **17**, 765-767, doi: 10.1038/s41423-020-0374-2.
 56. Xia, S., Liu, M., Wang, C., Xu, W., Lan, Q., et al. (2020) Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion, *Cell Res.*, **30**, 343-355, doi: 10.1038/s41422-020-0305-x.
 57. Smyth, M. S., and Martin, J. H. (2000) X Ray crystallography, *Mol. Pathol.*, **53**, 8-14, doi: 10.1136/mp.53.1.8.
 58. Smith, G. P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface, *Science*, **228**, 1315-1317, doi: 10.1126/science.4001944.
 59. Trier, N. H., Hansen, P. R., and Houen, G. (2012) Production and characterization of peptide antibodies, *Methods*, **56**, 136-144, doi: 10.1016/j.ymeth.2011.12.001.
 60. Lee, A. C., Harris, J. L., Khanna, K. K., and Hong, J. H. (2019) A comprehensive review on current advances in peptide drug development and design, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, doi: 10.3390/ijms20102383.
 61. Rabinowitz, J. A., Lainson, J. C., Johnston, S. A., and Diehnelt, C. W. (2018) Non-natural amino acid peptide microarrays to discover Ebola virus glycoprotein ligands, *Chem. Commun.*, **54**, 1417-1420, doi: 10.1039/c7cc08242h.
 62. Ingallinella, P., Bianchi, E., Ladwa, N. A., Wang, Y. J., Hrin, R., et al. (2009) Addition of a cholesterol group to an HIV-1 peptide fusion inhibitor dramatically increases its antiviral potency, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 5801-5806, doi: 10.1073/pnas.0901007106.
 63. Pessi, A., Bixler, S. L., Soloveva, V., Radoshitzky, S., Retterer, C., et al. (2019) Cholesterol-conjugated stapled peptides inhibit Ebola and Marburg viruses *in vitro* and *in vivo*, *Antiviral Res.*, **171**, 104592, doi: 10.1016/j.antiviral.2019.104592.
 64. Chen, G., Cook, J. D., Ye, W., Lee, J. E., and Sidhu, S. S. (2019) Optimization of peptidic HIV-1 fusion inhibitor T20 by phage display, *Protein Sci.*, **28**, 1501-1512, doi: 10.1002/pro.3669.
 65. Ding, X., Zhang, X., Chong, H., Zhu, Y., Wei, H., Wu, X., et al. (2017) Enfuvirtide (T20)-based lipopeptide is a potent HIV-1 cell fusion inhibitor: Implications for viral entry and inhibition, *J. Virol.*, **91**, doi: 10.1128/jvi.00831-17.
 66. Matsubara, T., Onishi, A., Saito, T., Shimada, A., Inoue, H., et al. (2010) Sialic acid-mimic peptides as hemagglutinin inhibitors for anti-influenza therapy, *J. Med. Chem.*, **53**, 4441-4449, doi: 10.1021/jm1002183.

67. Kadam, R. U., Juraszek, J., Brandenburg, B., Buyck, C., Schepens, W. B. G., et al. (2017) Potent peptidic fusion inhibitors of influenza virus, *Science*, **358**, 496–502, doi: 10.1126/science.aan0516.
68. Shilovskiy, I. P., Andreev, S. M., Kozhikhova, K. V., Nikolskii, A. A., and Khaitov, M. R. (2019) Prospects for the use of peptides against respiratory syncytial virus [in Russian], *Mol. Biol. (Mosk)*, **53**, 541–560, doi: 10.1134/s002689841904013x.
69. Brouwer, P. J. M., Caniels, T. G., van der Straten, K., Snitselaar, J. L., Aldon, Y., et al. (2020) Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability, *Science*, **369**, 643–650, doi: 10.1126/science.abc5902.
70. Wang, C., Li, W., Drabek, D., Okba, N. M. A., van Haperen, R., Osterhaus, A., et al. (2020) A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection, *Nat. Commun.*, **11**, 2251, doi: 10.1038/s41467-020-16256-y.
71. Sui, J., Li, W., Murakami, A., Tamin, A., Matthews, L. J., Wong, S. K., et al. (2004) Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2536–2541, doi: 10.1073/pnas.0307140101.
72. Walls, A. C., Xiong, X., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Snijder, J., et al. (2019) Unexpected receptor functional mimicry elucidates activation of coronavirus fusion, *Cell*, **176**, 1026–1039.e1015, doi: 10.1016/j.cell.2018.12.028.
73. Khavinson, V., Linkova, N., Dyatlova, A., Kuznik, B., and Umnov, R. (2020) Peptides: prospects for use in the treatment of COVID-19, *Molecules*, **25**, doi: 10.3390/molecules25194389.
74. Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Gao, H., Guo, F., et al. (2005) A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury, *Nat. Med.*, **11**, 875–879, doi: 10.1038/nm1267.
75. Mantovani, A., Locati, M., Vecchi, A., Sozzani, S., and Allavena, P. (2001) Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines, *Trends Immunol.*, **22**, 328–336, doi: 10.1016/s1471-4906(01)01941-x.
76. Dinarello, C. A. (1997) Interleukin-1, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **8**, 253–265, doi: 10.1016/s1359-6101(97)00023-3.
77. Idriss, H. T., and Naismith, J. H. (2000) TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s), *Microsc. Res. Tech.*, **50**, 184–195, doi: 10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H.
78. Pinto, D., Park, Y. J., Beltramello, M., Walls, A. C., Tortorici, M. A., et al. (2020) Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody, *Nature*, **583**, 290–295, doi: 10.1038/s41586-020-2349-y.
79. Zoufaly, A., Poglitsch, M., Aberle, J. H., Hoepler, W., Seitz, T., et al. (2020) Human recombinant soluble ACE2 in severe COVID-19, *Lancet Respir. Med.*, **8**, 1154–1158, doi: 10.1016/s2213-2600(20)30418-5.
80. Chan, K. K., Dorosky, D., Sharma, P., Abbasi, S. A., Dye, J. M., et al. (2020) Engineering human ACE2 to optimize binding to the spike protein of SARS coronavirus 2, *Science*, **369**, 1261–1265, doi: 10.1126/science.abc0870.
81. Lu, J., and Sun, P. D. (2020) High affinity binding of SARS-CoV-2 spike protein enhances ACE2 carboxypeptidase activity, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.07.01.182659.
82. Glasgow, A., Glasgow, J., Limonta, D., Solomon, P., Lui, I., et al. (2020) Engineered ACE2 receptor traps potently neutralize SARS-CoV-2, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.07.31.231746.
83. Chan, K. K., Tan, T. J. C., Narayanan, K. K., and Procko, E. (2020) An engineered decoy receptor for SARS-CoV-2 broadly binds protein S sequence variants, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.10.18.344622.
84. Zhang, G., Pomplun, S., Loftis, A. R., Tan, X., Loas, A., et al. (2020), Investigation of ACE2 N-terminal fragments binding to SARS-CoV-2 Spike RBD, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.03.19.999318.
85. Karoyan, P., Vieillard, V., Gómez-Morales, L., Odile, E., Guihot, A., et al. (2021) Human ACE2 peptide-mimics block SARS-CoV-2 pulmonary cells infection, *Commun. Biol.*, **4**, 197, doi: 10.1038/s42003-021-01736-8.
86. Rezaei Araghi, R., and Keating, A. E. (2016) Designing helical peptide inhibitors of protein-protein interactions, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **39**, 27–38, doi: 10.1016/j.sbi.2016.04.001.
87. Ali, A. M., Atmaj, J., Van Oosterwijk, N., Groves, M. R., and Dömling, A. (2019) Stapled peptides inhibitors: A new window for target drug discovery, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **17**, 263–281, doi: 10.1016/j.csbj.2019.01.012.
88. Morgan, D. C., Morris, C., Mahindra, A., Blair, C. M., Tejeda, G., et al. (2021) Stapled ACE2 peptidomimetics designed to target the SARS-CoV-2 spike protein do not prevent virus internalization, *Pept. Sci. (Hoboken)*, e24217, doi: 10.1002/pep2.24217.
89. Curreli, F., Victor, S. M. B., Ahmed, S., Drelich, A., Tong, X., et al. (2020) Stapled Peptides based on human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) potently inhibit SARS-CoV-2 infection *in vitro*, *mBio*, **11**, doi: 10.1128/mBio.02451-20.
90. Bibilashvili, R. S., Sidorova, M. V., Dudkina, U. S., Palkeeva, M. E., Molokoedov, A. S., et al. (2021) Peptide inhibitors of the interaction of the SARS-CoV-2 receptor-binding domain with the ACE2 cell receptor, *Biochem. Mosc. Suppl. B Biomed. Chem.*, **15**, 274–280, doi: 10.1134/s199075082104003x.
91. Krut, V. G., Astrakhantseva, I. V., Chuvpilo, S. A., Efimov, G. A., Ambaryan, S. G., et al. (2021) Antibodies to the N-terminal domain of angiotensin-converting enzyme (ACE2) that block its interaction with SARS-CoV-2 S protein, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **4**, 1–4, doi: 10.1134/S160767292201001X.

92. Larue, R. C., Xing, E., Kenney, A. D., Zhang, Y., Tuazon, J. A., et al. (2021) Rationally designed ACE2-derived peptides inhibit SARS-CoV-2, *Bioconjug. Chem.*, **32**, 215-223, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00664.
93. Adhikary, P., Kandel, S., Mamani, U. F., Mustafa, B., Hao, S., et al. (2021) Discovery of small anti-ACE2 peptides to inhibit SARS-CoV-2 infectivity, *Adv. Ther. (Weinh)*, 2100087, doi: 10.1002/adtp.202100087.
94. Wettstein, L., Kirchhoff, F., and Münch, J. (2022) The transmembrane protease TMPRSS2 as a therapeutic target for COVID-19 treatment, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 1351, doi: 10.3390/ijms23031351.
95. Iwata-Yoshikawa, N., Okamura, T., Shimizu, Y., Hasegawa, H., Takeda, M., et al. (2019) TMPRSS2 contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine models after Coronavirus infection, *J. Virol.*, **93**, doi: 10.1128/jvi.01815-18.
96. Lucas, J. M., Heinlein, C., Kim, T., Hernandez, S. A., Malik, M. S., et al. (2014) The androgen-regulated protease TMPRSS2 activates a proteolytic cascade involving components of the tumor microenvironment and promotes prostate cancer metastasis, *Cancer Discov.*, **4**, 1310-1325, doi: 10.1158/2159-8290.Cd-13-1010.
97. Bertram, S., Glowacka, I., Blazejewska, P., Soilleux, E., Allen, P., et al. (2010) TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells, *J. Virol.*, **84**, 10016-10025, doi: 10.1128/jvi.00239-10.
98. Böttcher-Friebertshäuser, E., Freuer, C., Sielaff, F., Schmidt, S., et al. (2010) Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors, *J. Virol.*, **84**, 5605-5614, doi: 10.1128/jvi.00140-10.
99. Bittle, J. L., Houghten, R. A., Alexander, H., Shinnick, T. M., Sutcliffe, J. G., et al. (1982) Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence, *Nature*, **298**, 30-33, doi: 10.1038/298030a0.
100. Langeveld, J. P., Casal, J. I., Osterhaus, A. D., Cortés, E., de Swart, R., et al. (1994) First peptide vaccine providing protection against viral infection in the target animal: studies of canine parvovirus in dogs, *J. Virol.*, **68**, 4506-4513, doi: 10.1128/JVI.68.7.4506-4513.1994.
101. Casal, J. I., Langeveld, J. P., Cortés, E., Schaaper, W. W., van Dijk, E., et al. (1995) Peptide vaccine against canine parvovirus: Identification of two neutralization subsites in the N terminus of VP2 and optimization of the amino acid sequence, *J. Virol.*, **69**, 7274-7277, doi: 10.1128/JVI.69.11.7274-7277.1995.
102. DiMarchi, R., Brooke, G., Gale, C., Cracknell, V., Doel, T., et al. (1986) Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide, *Science*, **232**, 639-641, doi: 10.1126/science.3008333.
103. Broekhuijsen, M. P., van Rijn, J. M., Blom, A. J., Pouwels, P. H., Enger-Valk, B. E., et al. (1987) Fusion proteins with multiple copies of the major antigenic determinant of foot-and-mouth disease virus protect both the natural host and laboratory animals, *J. Gen. Virol.*, **68**, 3137-3143, doi: 10.1099/0022-1317-68-12-3137.
104. Rydzynski, C., Moderbacher, C., Ramirez, S. I., Dan, J. M., Grifoni, A., Hastie, K. M., et al. (2020) Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity, *Cell*, **183**, 996-1012.e1019, doi: 10.1016/j.cell.2020.09.038.99.
105. Rammensee, H. G., Wiesmüller, K. H., Chandran, P. A., Zelba, H., Rusch, E., et al. (2019) A new synthetic toll-like receptor 1/2 ligand is an efficient adjuvant for peptide vaccination in a human volunteer, *J. Immunother. Cancer*, **7**, 307, doi: 10.1186/s40425-019-0796-5.102.
106. Nelde, A., Bilich, T., Heitmann, J. S., Maringer, Y., Salih, H. R., et al. (2021) SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition, *Nat. Immunol.*, **22**, 74-85, doi: 10.1038/s41590-020-00808-x.
107. Bilich, T., Nelde, A., Heitmann, J. S., Maringer, Y., Roerden, M., Bauer, J., et al. (2021) T cell and antibody kinetics delineate SARS-CoV-2 peptides mediating long-term immune responses in COVID-19 convalescent individuals, *Sci. Transl. Med.*, **13**, doi: 10.1126/scitranslmed.abf7517.
108. Barchuk, A., Cherkashin, M., Bulina, A., Berezina, N., Rakova, T., et al. (2021) Vaccine effectiveness against referral to hospital and severe lung injury associated with COVID-19: a population-based case-control study in St. Petersburg, Russia, *medRxiv*, doi: 10.1101/2021.08.18.21262065.
109. Shomuradova, A. S., Vagida, M. S., Sheetikov, S. A., Zornikova, K. V., Kiryukhin, D., et al. (2020) SARS-CoV-2 epitopes are recognized by a public and diverse repertoire of human T cell receptors, *Immunity*, **53**, 1245-1257.e1245, doi: 10.1016/j.immuni.2020.11.004.
110. Ferretti, A. P., Kula, T., Wang, Y., Nguyen, D. M. V., Weinheimer, A., et al. (2020) Unbiased screens show CD8⁺ T cells of COVID-19 patients recognize shared epitopes in SARS-CoV-2 that largely reside outside the spike protein, *Immunity*, **53**, 1095-1107.e1093, doi: 10.1016/j.immuni.2020.10.006.
111. Titov, A., Shaykhutdinova, R., Shcherbakova, O. V., Serdyuk, Y. V., Sheetikov, S. A., et al. (2022) Immunogenic epitope panel for accurate detection of non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2, *JCI Insight*, doi: 10.1172/jci.insight.157699.

CAN PEPTIDES HELP TO STOP COVID-19?

Review

V. G. Krut¹, S. A. Chuvpilo¹, I. V. Astrakhantseva¹, L. I. Kozlovskaya^{2,3}, G. A. Efimov⁴,
A. A. Kruglov^{5,6,7}, M. S. Drutskaya^{1,8}, and S. A. Nedospasov^{1,5,6,8*}

¹ *Sirius University of Science and Technology,
354340 Federal Territory Sirius/Sochi, Russia; e-mail: sergei.nedospasov@gmail.com*

² *FSBSI "Chumakov FSC R&D IBP RAS",
108819 Moscow, Russia*

³ *Institute of Translational Medicine and Biotechnology, Sechenov Moscow State Medical University,
119991 Moscow, Russia*

⁴ *National Medical Research Center of Hematology, Ministry of Health of the Russian Federation,
125167 Moscow, Russia*

⁵ *Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia*

⁶ *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia*

⁷ *German Rheumatism Research Center (DRFZ), a Leibniz Institute,
10117 Berlin, Germany*

⁸ *Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia*

Peptides are widely used in the diagnosis, prevention and therapy of certain human diseases. How useful can they be for the disease caused by the SARS-CoV-2 coronavirus? In this review, we discuss the possibility of using synthetic, recombinant peptides and polypeptides for the prevention of COVID-19, based on blocking the interaction of the virus with its main receptor ACE2, as well as the use of synthetic peptides in antiviral vaccines, taking into account emerging new variants of the virus.

Keywords: SARS-CoV-2, ACE2, vaccine, T-cell epitopes

СТРУКТУРНО МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЧАСТИЦЫ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ И БАКТЕРИОФАГОВ СО СПИРАЛЬНОЙ СТРУКТУРОЙ. СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ

Обзор

© 2022 О.А. Кондакова, Е.А. Евтушенко*, О.А. Баранов, Н.А. Никитин, О.В. Карпова

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет
119234 Москва, Россия; электронная почта: trifonova.katerina@gmail.com*

Поступила в редакцию 21.04.2022

После доработки 16.05.2022

Принята к публикации 16.05.2022

Структурно модифицированные частицы, полученные в процессе термического или химического воздействия на палочковидные или нитевидные вирионы вирусов растений и бактериофагов, в последнее время заслужили пристальное внимание исследователей как перспективные биогенные частицы для создания новых биотехнологий. В настоящем обзоре представлены литературные данные, посвящённые получению, структуре и свойствам структурно модифицированных частиц, в том числе их биобезопасности для животных, а также основные направления применения таких частиц в биомедицине. Отдельный раздел посвящён одному из наиболее актуальных и перспективных направлений использования структурно модифицированных вирусов растений – созданию вакцинных кандидатов на их основе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: структурно модифицированные вирусы, сферические частицы, вирусы растений, бактериофаги, вакцины, биотехнология, биомедицина.

DOI: 10.31857/S0320972522060033, **EDN:** AUCYWZ

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие структурно модифицированные частицы, полученные на основе вирусов растений или бактериофагов, становятся всё более привлекательной белковой платформой для различных применений в биотехнологии и биомедицине [1–8]. Такие частицы получают в процессе термического или химического воздействия на вирионы вирусов с палочковидной и нитевидной формой [9–12].

Изучение процесса происходящей структурной перестройки вирионов, свойств образующихся частиц, их взаимодействия с клетками/организмом млекопитающих имеют как фун-

даментальное, так и прикладное значение для создания новых биотехнологических платформ, в том числе для презентации антигенов, доставки лекарственных препаратов, получения биомаркёров.

Структурный переход от «палочек» к «сферам» для вируса табачной мозаики (ВТМ) (сем. *Virgaviridae*, род *Tobamovirus*) был впервые описан в 1956 г. Hart [13], однако детально изучен значительно позже на кафедре вирусологии биологического факультета МГУ [1, 10]. Эти исследования послужили толчком для дальнейших научных экспериментов и биомедицинских работ в РФ и других странах [2–4, 7, 14–22]. Так, американские исследователи сообщили об использовании структурно модифицированных частиц ВТМ для создания контрастирующих агентов для магнитно-резонансной томографии (МРТ) [2], а также доставки лекарств к опухолевой ткани при химиотерапии [3].

Большинство результатов, связанных со структурно модифицированными вирусами, получено с использованием ВТМ, хотя возмож-

Принятые сокращения: БО – белок оболочки; ВМАльт – вирус мозаики альтернантеры; ВМД – вирус мозаики долихоса; ВТМ – вирус табачной мозаики; ВШМЯ – вирус штриховатой мозаики ячменя; МРТ – магнитно-резонансная томография; СЧ – структурно модифицированные частицы сферической формы; ХВК – Х-вирус картофеля, β -CD – β -циклодекстрин; Gd – ион гадолиния (III).

* Адресат для корреспонденции.

ность структурной модификации продемонстрирована и для других вирусов растений [11, 12, 23], а также для бактериофагов [9, 24].

Структурная модификация вирионов позволяет получить дополнительные фундаментальные знания о строении и стабильности вирусов, так как условия структурной модификации могут отличаться для вирусов с идентичной морфологией.

Настоящий обзор посвящён анализу накопившихся на текущий момент данных о структуре, свойствах, безопасности и возможностях практического применения структурно модифицированных вирусов растений и бактерий.

СТРУКТУРНО МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЧАСТИЦЫ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ

Структурно модифицированные частицы вируса табачной мозаики. Характеристика и свойства. Вирус табачной мозаики представляет собой палочковидный вирус длиной 300 нм и диаметром 18 нм. Капсид ВТМ состоит из 2130 идентичных субъединиц белка оболочки (БО), которые собираются вокруг вирусной одноцепочечной РНК, образуя спиральную структуру с центральной полостью диаметром 2 нм [25]. ВТМ — классический объект вирусологии с момента её возникновения и один из наиболее изученных вирусов. Исследования ВТМ в значительной степени определили фундаментальные представления современной молекулярной вирусологии. Накопленные знания позволили создать на основе ВТМ новые платформы для использования в прикладных целях — медицине и биотехнологии [26].

В 1956 г. Hart [13], изучая методом электронной микроскопии морфологические изменения, вызванные нагреванием препарата ВТМ, сообщил, что инкубация при температуре 80–98 °С в течение 10 с приводила к набуханию частиц ВТМ на одном или обоих концах с последующим превращением в «шаровидные частицы» (ball particles), причём объём частиц был сопоставим с объёмом исходной «палочки». Эти исследования не были продолжены и, можно сказать, про них «забыли» до 2011 г., когда была опубликована статья Atabekov et al. [10], в которой такие частицы вновь были получены и исследованы с использованием современных экспериментальных методов и подходов. Эта публикация стала первой в цикле работ, где были подробно изучены условия образования, физико-химические свойства и структура полученных в ходе термической перестройки ВТМ частиц, которые получили название «сферические частицы» (СЧ) или «spherical particles» (SPs) [1, 10, 27–31]. Проведённые исследования продемонстрировали, что в результате термического воздействия на нативные частицы вируса могут быть получены СЧ ВТМ заданного размера. Структурно модифицированные частицы ВТМ изучались с использованием различных методов (электронная микроскопия, метод анализа траекторий наночастиц, метод динамического рассеяния света), дополняющих друг друга, что позволило дать точную характеристику СЧ. Структурный переход вирионов ВТМ в СЧ происходит через промежуточные формы. На первом этапе формируются гантелевидные структуры, которые в дальнейшем трансформируются в сферические частицы. СЧ ВТМ являются однородными по форме и обладают высокой ста-

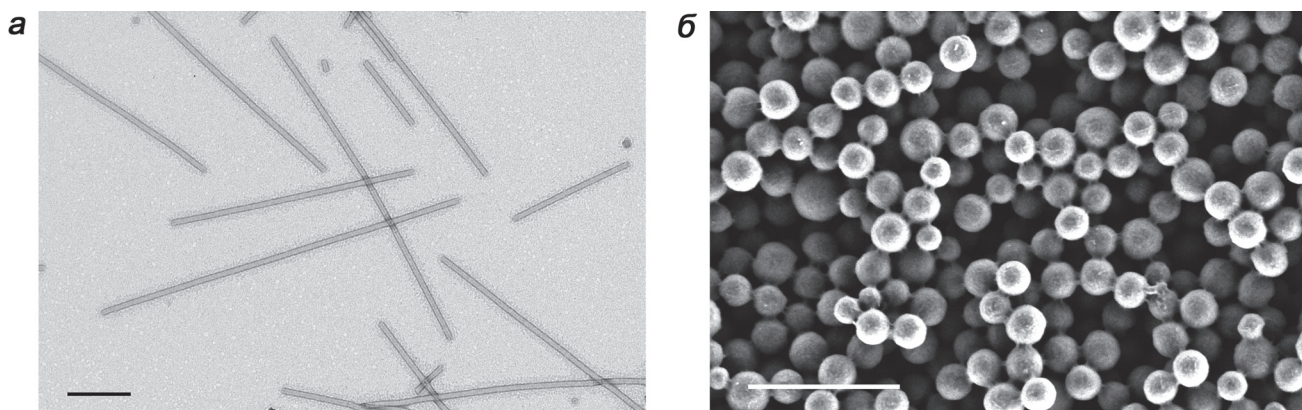


Рис. 1. Структурно модифицированные частицы, полученные при термической перестройке вирионов ВТМ. *а* — ВТМ, просвечивающая электронная микроскопия, контрастирование 2%-ным раствором уранилацетата, размер метки — 200 нм; *б* — СЧ ВТМ, сканирующая электронная микроскопия, размер метки — 2 мкм. Изображения получены на кафедре вирусологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

бильностью. Они не образуют агрегатов и не меняют размеры и формы при хранении в течение не менее 6 месяцев, а также при различных воздействиях, включая осаждение центрифугированием при 10 000 g, повторный нагрев до температуры 98 °С и охлаждение, многократное замораживание до –20 °С с последующим оттаиванием [10]. В ряде работ продемонстрирована возможность получения СЧ ВТМ в препаративных количествах [19, 32]. Важным свойством СЧ ВТМ является то, что их размеры зависят от концентрации исходного препарата вируса, что позволяет получать СЧ ВТМ заданного диаметра (рис. 1) [10, 32].

В отличие от вирионов ВТМ, СЧ ВТМ не содержат РНК, а белок, выделенный из них, не может быть собран в регулярную структуру, что указывает на то, что термическая денатурация является необратимой [10]. Структурные характеристики белка СЧ ВТМ, полученные методами кругового дихроизма, спектроскопии комбинационного рассеяния и флуоресцентной спектроскопии, имеют значительные отличия от структуры БО в составе нативного ВТМ. Перестройка вирионов ВТМ в СЧ сопровождается увеличением плотности частиц и переходом субъединиц БО к структуре с низким содержанием α -спиралей и значительной долей β -структур. СЧ ВТМ также демонстрируют сильную реакцию с тиофлавином Т, что свидетельствует о появлении кросс- β -структур [28]. Сравнительное исследование аминокислотного состава поверхности СЧ и вирионов ВТМ методом тритиевой планиграфии установило, что сборка из термически денатурированных белковых субъединиц делает поверхность СЧ существенно более гидрофобной [31]. Таким образом, в условиях термической денатурации субъединицы БО ВТМ приобретают специфическую конформацию, благоприятную для сборки стабильных СЧ, при этом аминокислотный состав поверхности СЧ значительно отличается от вирионов ВТМ.

В результате термической перестройки СЧ ВТМ приобретают свойства отличные от вирионов, в частности, уникальные адсорбционные возможности. СЧ ВТМ обладают способностью адсорбировать на своей поверхности белковые молекулы различного размера и состава (в том числе антигены патогенов человека), полимеры и нативные вирусные частицы небольшого размера сферической формы [1, 4, 7, 27, 29, 30, 33–35]. При этом процесс получения комплексов СЧ с целевыми агентами чрез-

вычайно прост и представляет собой короткую инкубацию (10–15 мин), необходимую для связывания молекул или вирионов с поверхностью СЧ за счёт нековалентных связей. Другое свойство СЧ ВТМ, продемонстрированное нашей группой в нескольких работах, — усиление иммунного ответа на антигены различной природы и молекулярной массы, адсорбированные на их поверхности [1, 4, 7, 34].

Все эти свойства позволили рассматривать возможность использования СЧ ВТМ как биогенной белковой платформы и разрабатывать подходы для их практического применения.

Применение СЧ ВТМ при создании вакцинных препаратов. Ключевой особенностью современной вакцинологии, которая широко использует рекомбинантные бактериальные и вирусные антигены, является поиск новых безопасных адъювантов с целью улучшить иммуногенность антигенов, снизить дозу активных веществ вакцины и стоимость её производства. Адъюванты не только усиливают иммунный ответ и его продолжительность, но также могут влиять на тип ответа (гуморальный и/или клеточный). Известно, что адъюванты стимулируют иммунный ответ на различные антигены с различной эффективностью и, как сообщается, например, для адъювантов на основе соединений алюминия, в некоторых случаях являются малоэффективными [36–39].

СЧ ВТМ, безусловно, имеют потенциал для разработки вакцин и были использованы для получения комплексов с рекомбинантными антигенами коронавируса [7], вируса краснухи [4], ротавируса [40], возбудителя сибирской язвы [35] и вируса птичьего гриппа [41] (табл. 1).

Полученные комплексы СЧ ВТМ с антигенами (вакцинные кандидаты) находятся на различных стадиях разработки, но во всех случаях методами флуоресцентной микроскопии, иммуноэлектронной и/или иммунофлуоресцентной микроскопии показана возможность адсорбции рекомбинантных антигенов и антигенная специфичность белков в составе комплексов. В недавно опубликованной работе СЧ ВТМ использованы в качестве платформы (депо) и адъюванта при разработке вакцины против COVID-19. Показано, что СЧ ВТМ значительно усиливают иммуногенность (общие титры IgG) рекомбинантных антигенов в составе композиций и способствуют стимуляции сбалансированного Th1/Th2-иммунного ответа. Вакцинный кандидат при иммунизации сирийских хомяков индуцирует выработку антител, ней-

Таблица 1. Прототипы вакцинных кандидатов, полученных с использованием СЧ ВТМ

Вакцинный кандидат	Валентность	Антиген	Ссылки
Вирус краснухи	моновалентная	эпитоп белка E1	[4]
Вирус гриппа птиц	поливалентная	эпитопы белков HA и M2	[41]
Вирус бешенства	моновалентная	инактивированный вирион	[42]
Ротавирус	моновалентная	эпитоп белка VP6	[40]
Вирус Пуумала (хантавирус)	моновалентная	инактивированный вирион	[38]
Коронавирус SARS-CoV-2	поливалентная	RBD-домен, консервативные фрагменты S2-субъединицы	[7]
Бактерия <i>Bacillus anthracis</i>	моновалентная	протективный антиген – PA	[35]

трализирующих SARS-CoV-2, что свидетельствует о перспективности данного подхода [7]. В других исследованиях также показаны адъювантные свойства СЧ ВТМ. Вакцинный кандидат против краснухи, представляющий собой комплексы антигена (тетраэпитопа А гликопротеина E1) с СЧ ВТМ, обеспечивал значительное увеличение титров антител (примерно в 10 раз) по сравнению с иммунизацией только одним антигеном или смесью антигена с адъювантом на основе гидроксида алюминия [4]. В настоящее время успешно завершены доклинические испытания вакцинного кандидата против краснухи на основе СЧ ВТМ.

СЧ значительно усиливают гуморальный иммунный ответ при иммунизации животных инактивированной вакциной против вируса Пуумала и обладают адъювантной активностью в отношении продукции цитокинов IL-12 и IFN- γ [38]. Показано, что СЧ усиливают протективные свойства широко используемой российской безадъювантной антирабической вакцины «Рабикан», полученной из инактивированного вируса бешенства. Результаты продемонстрировали усиление протективной активности вакцины «Рабикан» при совместном применении с СЧ ВТМ, сопоставимое с эффектом неполного адъюванта Фрейнда [42] (табл. 1).

В ряде работ продемонстрировано, что при иммунизации животных вакцинными кандидатами на основе СЧ ВТМ большая часть антител вырабатывается на целевой антиген, а не на белковую частицу, используемую в качестве адъюванта [4, 7].

Другое применение СЧ ВТМ при разработке вакцинных препаратов — использование

их для стабилизации антигенов при хранении. Известно, что белки — компоненты лекарственных препаратов — могут подвергаться спонтанной деградации в процессе производства и хранения. В наших работах, в частности, продемонстрирована возможность стабилизации протективного антигена — основного антигена возбудителя сибирской язвы — за счёт адсорбции на поверхности СЧ ВТМ. Рекомбинантный протективный антиген (rPA) является главным компонентом практически всех разрабатываемых в настоящее время вакцин. Нестабильность этого белка связана главным образом с наличием сайтов протеолиза и спонтанным дезамидированием остатков аспарагина в составе белка, что приводит к его деградации. Скорость дезамидирования значительно увеличивается, когда гидроксид алюминия используется в качестве адъюванта, что в конечном итоге значительно снижает протективные свойства вакцин при хранении и клинических применениях [43, 44]. В проведённых исследованиях показано, что rPA с внесёнными аминокислотными заменами сайтов, ответственных за дестабилизацию белка, и адсорбированный на поверхности СЧ ВТМ проявляет высокую стабильность при хранении [8, 35].

Применение СЧ ВТМ в качестве носителя для функционально-активных молекул и в противоопухолевой терапии. В ряде исследований разработаны методы для ковалентного связывания функционально активных молекул с СЧ ВТМ, а также методы их инкапсуляции во время термической перестройки.

В работе исследовательской группы под руководством Dr. N.F. Steinmetz показана способность эффективной биоконъюгации за счёт

функциональных групп аминокислотных остатков лизина (аминогруппа), аспарагиновой и глутаминовой кислот (карбоксильная группа) и цистеина (тиоловая группа) на поверхности СЧ ВТМ [3]. Химическая модификация СЧ ВТМ расширяет возможности их применения при создании комплексов с функционально-активными соединениями для различных биомедицинских приложений. Так, показана возможность конъюгации СЧ ВТМ за счёт ковалентного связывания карбоксильной группы глутаминовых кислот с химиотерапевтическим препаратом доксорубицином. Параллельно авторы проверяли возможность нековалентной инкапсуляции доксорубицина при его простом добавлении к вирионам ВТМ в процессе термической перестройки. При использовании двух линий раковых клеток молочной железы оба подхода продемонстрировали эффективную доставку лекарственного препарата (поглощение клетками) и уничтожение раковых клеток.

В другой работе той же группой учёных проведён сравнительный анализ способности вирионов ВТМ и СЧ ВТМ стимулировать противоопухолевый ответ на клетках меланомы B16F10, высокоагрессивной и слабоиммунной модели опухоли, широко используемой для исследований различных препаратов в иммунотерапии [22]. Ранее на этой модели была показана противоопухолевая активность различных вирусов растений, от икосаэдрического вируса мозаики коровьего горошка (ВМКГ) до нитевидных X-вирусов картофеля (ХВК) и вируса мозаики папайи [45–47]. На экспериментальной мышинной модели с индуцированной меланомой продемонстрировано, что интратуморальное введение суспензии ВТМ и СЧ ВТМ приводит к снижению скорости роста опухоли и увеличению времени выживания животных. Однако сравнительный анализ обоих препаратов на основе ВТМ показал более низкую эффективность в экспериментах по сравнению с ВМКГ. Тем не менее авторы отмечают, что в работе использованы СЧ ВТМ с достаточно большим диаметром частиц для подобных исследований (около 250 нм), и допускают формирование более эффективной защиты при использовании частиц меньшего размера [22].

В работе Wu et al. [20] использован β -циклодекстрин (β -CD) для химической модификации поверхности вирионов ВТМ. При термической перестройке таких частиц образовывались СЧ, имеющие средний диа-

метр 88 нм. Продемонстрирована возможность образования комплекса СЧ, модифицированного β -CD, с адамантаном (химическое соединение и его аналоги, применяемые в терапии различных заболеваний) [20]. Учитывая тот факт, что ранее эти же авторы изучили возможность сборки подобных комплексов на основе модифицированных β -CD нативных вирионов ВТМ, в которые, помимо адамантана, входили фолиевая кислота, родамин В, доксорубицин и полиэтиленгликоль [48], учёные предположили, что такой подход имеет перспективы для сборки супрамолекулярных комплексов.

В ряде работ продемонстрирована возможность иммобилизации наночастиц золота и серебра на поверхности СЧ ВТМ [21, 49]. Результаты этих исследований могут иметь потенциальное применение, например, при разработке биосенсоров, а также в противоопухолевой и антибактериальной терапии. К сожалению, несмотря на представленные результаты, демонстрирующие возможность модификации поверхности СЧ ВТМ различными металлами, новые публикации этих научных коллективов отсутствуют. Многообещающие результаты по иммобилизации на поверхности СЧ ВТМ ионов металлов получены научной группой под руководством Dr. N.F. Steinmetz. Учёные модифицировали внутреннюю поверхность вирионов ВТМ хелатными комплексами гадолиния (III) (Gd), широко используемыми в клинической практике в качестве контрастных агентов при проведении МРТ. Полученные комплексы СЧ ВТМ–Gd (диаметром 170 нм) обеспечивали более высокое время релаксации по сравнению со свободным хелатным комплексом Gd и ВТМ–Gd, сопоставимое с такими высоко контрастирующими агентами для МРТ, как синтетические дендримеры, конъюгированные с хелатным комплексом с Gd [2, 14]. Чтобы пролонгировать действие таких комплексов в организме, учёные покрыли комплексы СЧ ВТМ–Gd (диаметром 75 нм) биологически инертным и стабильным кремнезёмом (диоксид кремния). Минерализация СЧ ВТМ–Gd привела к почти трёхкратному увеличению времени релаксации. При этом такие комплексы, в отличие от СЧ ВТМ–Gd без кремнезёма, быстрее поглощались макрофагами и были защищены от распознавания антител. Авторы заключили, что СЧ ВТМ–Gd, покрытые кремнезёмом, могут найти применение в МРТ-диагностике заболеваний, связанных с воспалительным процессом [18].

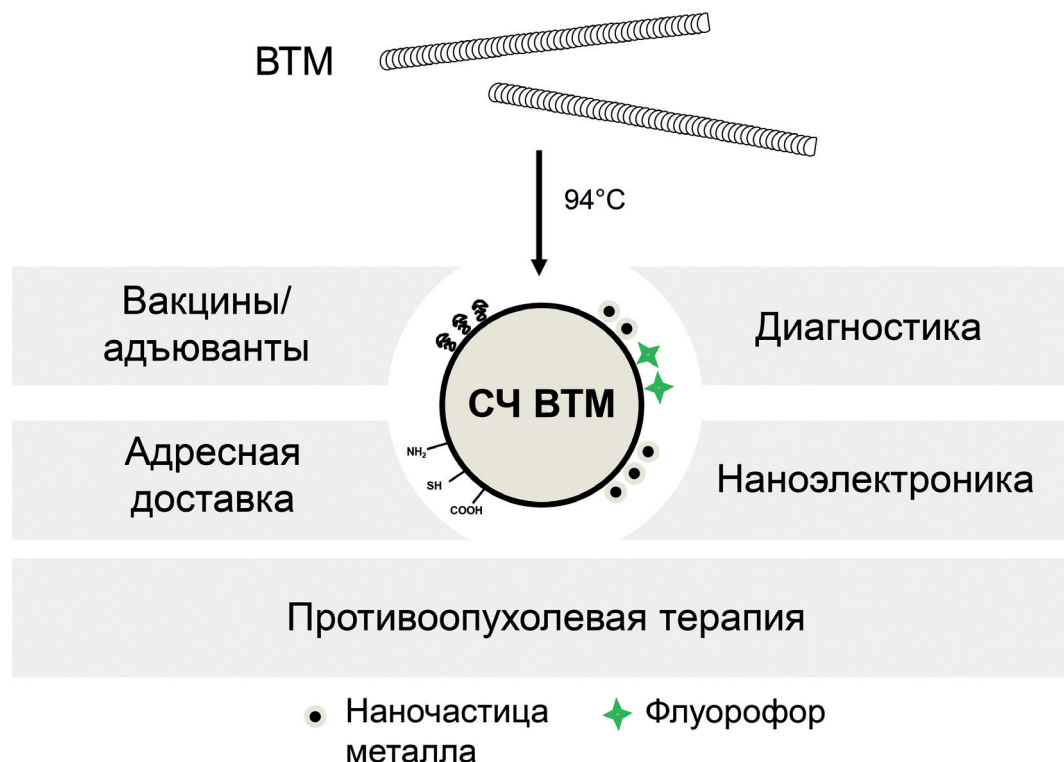


Рис. 2. Возможные области применения СЧ ВТМ

При исследовании возможных применений СЧ ВТМ в биотехнологии и медицине используется большой арсенал подходов, ранее опробованных и изученных на примере различных вирионов вирусов растений. Способность СЧ ВТМ проникать в клетки вместе с возможностью химической биоконъюгации и нековалентной инкапсуляции различных терапевтически значимых соединений позволяют рассматривать их как привлекательную платформу для доставки лекарственных и маркерных средств и могут найти своё применение в медицине. Основные возможные направления практического применения СЧ ВТМ представлены на рис. 2.

Структурно модифицированные частицы на основе вирусов растений с различной морфологией. В настоящее время именно ВТМ чаще других фитовирусов представлен в биотехнологических и биомедицинских исследованиях. Однако и другие вирусы растений, обладающие отличной от ВТМ морфологией/строением, могут быть структурно модифицированы при физическом воздействии. Структурно модифицированные частицы сферической формы были получены при термической обработке палочковидных вирионов представителя рода тобамовирусов — вируса мозаики долихо-

са (ВМД), гордеивирусов — вируса штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ) [23], нитевидных вирионов потивирусов — А-вируса картофеля (АВК) [50] и потексвирусов: вируса мозаики альтернантеры (ВМАльт) [12] и Х-вируса картофеля (ХВК) [11]. Следует отметить, что попытки воздействовать температурой на вирионы вирусов растений с икосаэдрическим типом симметрии не увенчались успехом. Так, при термической обработке сферических вирионов вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК) и вируса мягкой мозаики фасоли (ВММФ) структурная модификация не происходит, изменений в морфологии и размерах вирионов не обнаружено [23].

Термическая перестройка вирионов у других фитовирусов с палочковидной или нитевидной формой, относящихся к различным таксономическим группам, в сферические частицы происходит так же, как и у ВТМ: в два этапа через образование промежуточных форм. Полная структурная перестройка у ВШМЯ, ВМД и ВМАльт происходит при температуре 94 °С, а у ХВК — при 90 °С (табл. 2).

Различия в температурах и условиях термической перестройки морфологически сходных вирусов растений (ХВК и ВМАльт) свидетельствуют о различиях в структуре и стабиль-

Таблица 2. Возможность термической перестройки вирусов растений и свойства СЧ, полученных из них

Название	ВТМ	ВМД	ВШМЯ	ВМАльт	ХВК	АВК	ВММФ	ВМЦК
Семейство, Род	Virgaviridae, <i>Tobamovirus</i>	Virgaviridae, <i>Tobamovirus</i>	Virgaviridae, <i>Hordeivirus</i>	Alphaflexi- viridae, <i>Potexvirus</i>	Alphaflexi- viridae, <i>Potexvirus</i>	Potyviridae, <i>Potyvirus</i>	Tombus- viridae	Caulimo- viridae, <i>Caulimovirus</i>
Морфология вириона	палочко- видный	палочко- видный	палочко- видный	нитевидный	нитевидный	нитевидный	сфери- ческий	сфери- ческий
Геном	РНК	РНК	РНК	РНК	РНК	РНК	РНК	ДНК
Трансформация в СЧ	да	да	да	да	да	да	нет	нет
Температура структурного перехода, °С	94	94	94	94	90	60*	—	—
Зависимость размера от концентрации	да	да	нет	да	да	н/а	—	—
Наличие в СЧ кросс-β- структур	да	н/а	н/а	да	да	да	—	—
Изменение аминокислот- ного состава поверхности	да	н/а	н/а	да	н/а	н/а	—	—
Адсорбционные свойства	да	н/а	н/а	да	да	н/а	—	—

Примечание. н/а — не анализировали.

* Условия формирования СЧ отличаются от условий получения СЧ из других вирусов растений.

ности вирионов. Для СЧ ХВК и СЧ ВМАльт показано, что они не содержат РНК. Исследования структуры белка в составе СЧ ХВК и СЧ ВМАльт выявили различия во вторичной и третичной структурах БО СЧ и БО в нативных вирионах [11, 12]. Аналогично в СЧ ВТМ структурный переход сопровождается появлением большего количества β-структур в составе белка по сравнению с вирионами. Проанализированы адсорбционные свойства СЧ и способность связывать модельные антигены на своей поверхности. Полученные характеристики СЧ ХВК и СЧ ВМАльт указывают на потенциальную возможность их применения в качестве платформ для презентации целевых антигенов и создания функционально активных комплексов. Также для СЧ ВМАльт показано наличие химически реактивных поверхностных аминокислот [12].

Исследования структурно модифицированных частиц сферической формы, полученных из различных представителей фитовирусов, должны быть продолжены. Весьма вероятно, что их свойства и особенности, отличающие их от СЧ ВТМ, найдут своё применение при создании биогенных платформ и дадут дополнительную информацию о строении вирионов.

Безопасность применения СЧ. Вирусы растений безопасны для млекопитающих, они не являются для них патогенными и не могут размножаться в клетках человека [51]. В исследовании *in vitro* возможности биodeградации белка в составе СЧ продемонстрировало, что СЧ ВТМ подвергаются полному протеолизу в присутствии протеиназы К, в то время как нативные вирионы остаются устойчивыми к воздействию фермента [27]. Исследование профиля биораспределения СЧ ВТМ с диаметром около 50 нм

у мышей показало, что они накапливаются преимущественно в селезёнке и печени через 4 ч после инъекции и выводятся из циркуляции макрофагами. Через 24 ч после введения СЧ не обнаруживаются в тканях животных, что даёт преимущество перед синтетическими материалами небиологического происхождения, которые могут сохраняться в тканях в течение длительного периода и биodeградация которых сопровождается побочными продуктами, приводящими к индукции окислительного стресса, а также апоптоза [52]. СЧ ВТМ демонстрируют хорошую совместимость с кровью (не вызывают гемолиз или свёртывание) и тканями (отсутствие признаков воспаления, апоптоза, дегенерации или некроза) [15]. В результате дальнейших исследований, проведённых на трёх видах животных (мыши, крысы, кролики), при введении СЧ ВТМ диаметром 300 нм внутримышечно или внутрибрюшинно установлено, что СЧ не обладают токсичными свойствами. Оценка включала доклинические исследования местной переносимости после однократного введения, а также местных и системных эффектов после многократного введения СЧ, в том числе физиологические, гистологические и гематологические изменения, а также исследования токсичности для репродуктивной системы [53, 54]. Безопасность СЧ в составе вакцинного кандидата против краснухи также продемонстрирована в доклинических исследованиях на трёх видах животных (мыши, крысы, кролики) [4].

Таким образом, в ряде работ показано, что СЧ ВТМ биологически совместимы с клетками животных, биоразлагаемы и безопасны.

СТРУКТУРНО МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЧАСТИЦЫ БАКТЕРИОФАГОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Возможность получения структурно модифицированных сферических частиц продемонстрирована для бактериофага М13 (семейство *Inoviridae*, род *Inovirus*). Вирионы М13 имеют нитевидную форму длиной 880 нм и диаметром 6,5 нм [55]. В состав вириона бактериофага М13 входит одноцепочечная кольцевая ДНК (6407 нт), которая упакована примерно в 2700 копий основного белка капсида р8 [5, 24, 56]. Белок р8 практически на 100% состоит из α -спиралей [9]. В состав капсида также входят минорные белки р3, р6, р5 и р9 [5]. Интересно

отметить, что в данном случае структурный переход происходил не под воздействием высокой температуры, а при кратковременной обработке суспензии фаговых частиц равным объёмом хлороформа при температуре 24 °С [9]. Возможность структурной модификации также продемонстрирована и для других представителей рода *Inovirus*: для бактериофагов fd и f1 [24, 57]. Показано, что при обработке хлороформом происходят изменения в гидрофобных взаимодействиях между субъединицами белка р8, а 2/3 вирусной ДНК высвобождается через пору, образованную пятью субъединицами минорного белка р3. Таким образом, обработка хлороформом вирионов нитевидных бактериофагов приводит к формированию сферических частиц с асимметричным расположением белков р8 и р3 [5, 9, 57]. Размер сферических частиц, формирующихся в результате структурной перестройки бактериофага М13 (СЧ М13), по данным просвечивающей электронной микроскопии, составляет около 39 нм и сохраняется стабильным в течение 12 ч при инкубации во льду или при комнатной температуре. Однако при более длительной инкубации размер СЧ М13 становится более переменным и может увеличиваться [24]. При структурной модификации М13, как и в случае с белком оболочки ВТМ, наблюдается понижение содержания α -спиралей в составе белка р8 [9]. Контрастирование сферических частиц, образующихся из фага М13 (СЧ М13), с помощью фосфовольфрамовой кислоты позволило продемонстрировать наличие полости в данных наночастицах [24]. Следует отметить, что СЧ ВТМ, в отличие от СЧ М13, не являются полыми [32]. Понижение температуры обработки хлороформом до 2 °С позволило зафиксировать образование промежуточной формы при структурном переходе нитевидных вирионов в СЧ М13. Переходная форма представлена палочковидной частицей длиной 250 нм и шириной 15 нм, имеющей полый центральный канал и уширение на одном конце, увеличение которого впоследствии и приводит к формированию сферической частицы [9].

Возможность структурной модификации нитевидных бактериофагов под действием хлороформа была продемонстрирована ещё в начале 80-х гг. XX века [9]. Однако только в 2007 г. появилась публикация Olsen et al. [58], посвящённая возможности использования сфероидов из нитчатых бактериофагов семейства *Inoviridae* в качестве компонентов биосенсоров

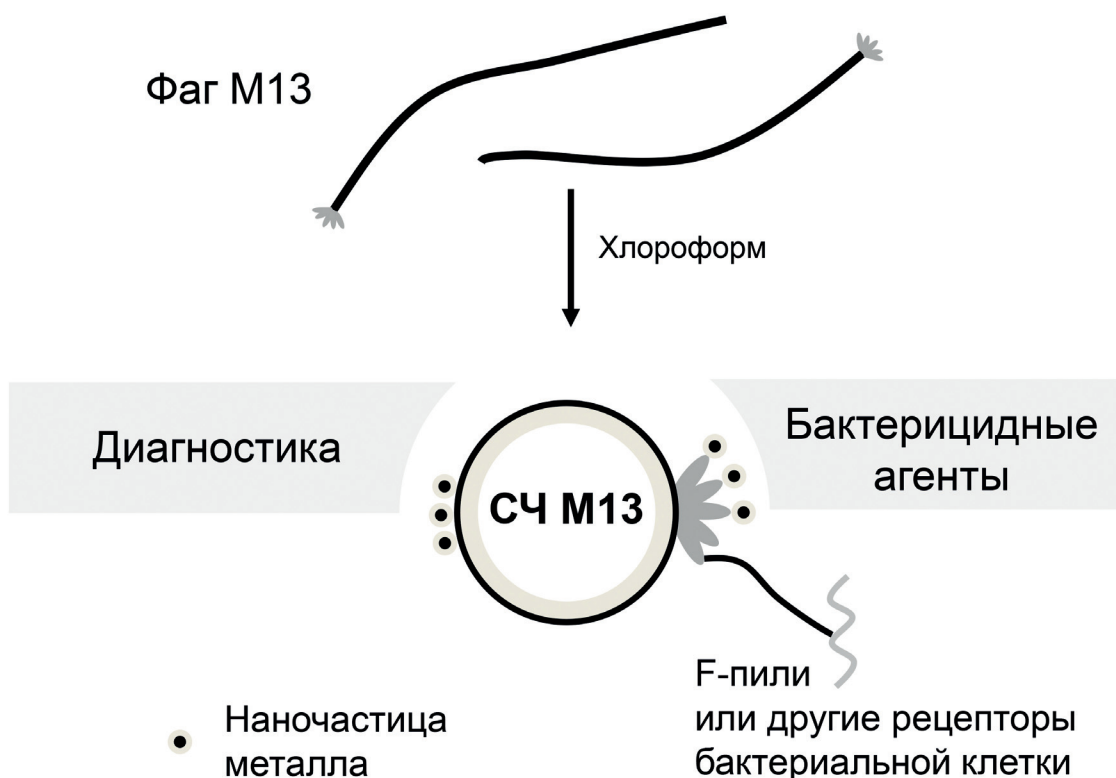


Рис. 3. Возможные области применения СЧ M13

к *Salmonella typhimurium*. Для этого методом фагового дисплея были получены нитчатые бактериофаги, аффинные к *S. typhimurium*, которые после обработки хлороформом превращались в сферические частицы. Полученные СЧ в дальнейшем использовались для создания аффинного монослоя биосенсора. Описанная выше работа, а также ряд публикаций по СЧ BTM и демонстрации их биотехнологического потенциала возродили интерес к СЧ на основе нитчатых бактериофагов [1, 2, 10, 58]. Группой учёных из университета Калифорнии опубликован ряд работ, посвящённых получению и применению СЧ M13, аффинных к золоту [6, 55, 59]. Для промежуточных форм СЧ M13 и для СЧ M13, покрытых золотом, продемонстрирована возможность выступать в качестве фототермически индуцированного антибактериального агента на примере клеток *Escherichia coli*. Интересно, что размер образующихся промежуточных форм (161 ± 33 нм) и СЧ (60 нм), несущих в составе белка р8 пептид, аффинный к золоту, отличался от СЧ и промежуточных форм из нативного M13. Стоит отметить, что минорный белок капсида р3 в составе промежуточных форм и СЧ M13 сохраняет свою способность к связыванию с рецепторами *E. coli*,

что позволяет рассматривать данные частицы в качестве направленного антибактериального агента, способного осуществлять фототермический лизис бактериальных клеток. Авторы данного исследования предполагают, что, модифицируя белок р3, можно расширить спектр бактерий, с которыми будут связываться структурно модифицированные частицы на основе M13, покрытые золотом [6]. В другой работе этой же научной группы благодаря одновременной модификации белков р8 (модифицирован пептидом, аффинным к золоту) и р3 (модифицирован пептидом, аффинным к цинку) бактериофага M13 и последующей обработке хлороформом удалось получить бифункциональные СЧ M13. В дальнейшем на поверхности бифункциональных СЧ M13 проводился синтез Au и ZnS, и таким образом были получены гибридные наноструктуры, асимметрично покрытые золотом и сульфидом цинка [5]. Ранее было показано, что наночастицы Au/ZnS могут рассматриваться в качестве регенерируемых катализаторов для фотокаталитических реакций [60].

Принимая во внимание рассмотренные результаты, можно предположить, что СЧ, полученные путём обработки нитевидных бак-

териофагов семейства Inoviridae, могут найти применение при разработке бактерицидных агентов, биосенсоров для диагностики, а также в качестве каркаса для создания гибридных наноструктур (рис. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Через полвека после обнаружения структурной перестройки при термической обработке палочковидных вирионов ВТМ в частицы сферической формы интенсивное развитие биомедицины вызвало интерес к более детальному изучению данного феномена и привело к многочисленным публикациям, посвящённым свойствам и применению структурно модифицированных вирусных частиц. Изучение условий и особенности структурной модификации морфологически сходных вирусных частиц может позволить получить важные фундаментальные знания о строении, структуре и стабильности вирионов. Основные исследования, посвящённые характеристике и потенциальным областям применения структурно модифицированных частиц вирусов растений, выполнены на СЧ ВТМ. Уникальные адсорбционные свойства СЧ ВТМ и эффективные иммуностимулирующие свойства, а также широкие возможности модификации поверхности СЧ ВТМ делают их перспективной платформой для создания различных биотехнологий. Важную роль для возможного использования СЧ в медицине играют такие свойства, как биосовместимость, безопасность и биоразлагаемость. В литературе описаны результаты исследований, убедительно продемонстрировавшие, что СЧ ВТМ обладают противоопухолевой активностью, могут стать платформой/адъювантом для создания вакцинных кандидатов против вирусных и бактериальных инфекций, а также найти применение в диагностике и микроэлектронике.

Однако не стоит ограничивать исследования возможности применения структурно модифицированных вирусных частиц только СЧ ВТМ. Нельзя исключить, что подобные частицы, полученные из вирионов других вирусов растений, позволят получить биогенные платформы с новыми свойствами, отличными от СЧ ВТМ. Простота выделения и очистки вирусов растений, потенциальные возможности масштабирования их коммерческого производства, а также безопасность для человека и животных представляют собой важные преим-

ущества СЧ вирусов растений по сравнению с другими биополимерами и синтетическими наноматериалами.

Помимо структурно модифицированных частиц вирусов растений, внимания заслуживают работы по получению СЧ из нитевидных бактериофагов. Был предложен целый ряд направлений их возможного применения. Так, СЧ М13 представляют особый интерес в качестве фототермических бактерицидных агентов и каркаса/носителя для создания комплексов с различными соединениями металлов. Уже появились эффективные методы получения бактериофага М13 в необходимых для практического использования количествах и с высокой степенью очистки [61], что позволяет рассматривать его как перспективный объект для будущих разработок.

Стоит отметить, что в настоящее время спектр направлений практического применения структурно модифицированных вирусных частиц соотносится с подходами, предложенными ранее для вирионов и вирусоподобных частиц вирусов растений [62–64]. Разработки, осуществлённые на нативных вирионах вирусов растений и бактериофагах, сыграли существенную роль при проведении работ со структурно модифицированными частицами. Можно ожидать, что благодаря своим уникальным характеристикам эти частицы могут найти применение и в новых направлениях биотехнологии и медицины.

Приведённые данные позволяют, на наш взгляд, сделать однозначный вывод, что изучение структурно модифицированных вирусных частиц представляет собой актуальное и перспективное направление. Результаты таких исследований могут иметь практическое приложение в современной вирусологии и биотехнологии.

Вклад авторов. О.В. Карпова, Н.А. Никитин – концепция обзорной статьи; О.А. Кондакова, Е.А. Евтушенко, О.А. Баранов и Н.А. Никитин – сбор и анализ литературы, написание текста; Е.А. Евтушенко, Н.А. Никитин и О.В. Карпова – редактирование текста обзора; О.А. Баранов и Н.А. Никитин – создание иллюстраций.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда в рамках приоритетного направления деятельности РНФ «Проведение фундаментальных научных

исследований и поисковых научных исследований отдельными научными группами» (грант № 18-14-00044).

Благодарности. Исследование было выполнено в рамках научного направления Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или иной сфере.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утверждённым правовым актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Karpova, O., Nikitin, N., Chirkov, S., Trifonova, E., Sheveleva, A., et al. (2012) Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platforms and foreign antigens, *J. Gen. Virol.*, **93**, 400-407, doi: 10.1099/vir.0.036293-0.
2. Bruckman, M. A., Hern, S., Jiang, K., Flask, C., Yu, X., et al. (2013) Tobacco mosaic virus and spheres as supramolecular high-relaxivity MRI contrast agents, *J. Mat. Chem. B*, **1**, 1482-1490, doi: 10.1039/C3TB00461A.
3. Bruckman, M. A., Czapar, A. E., VanMeter, A., Randolph, L. N., and Steinmetz, N. F. (2016) Tobacco mosaic virus-based protein nanoparticles and nanorods for chemotherapy delivery targeting breast cancer, *J. Control Rel.*, **231**, 103-113, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.02.045.
4. Trifonova, E. A., Zenin, V. A., Nikitin, N. A., Yurkova, M. S., Ryabchevskaya, E. M., et al. (2017) Study of rubella candidate vaccine based on a structurally modified plant virus, *Antiviral Res.*, **144**, 27-33, doi: 10.1016/j.antiviral.2017.05.006.
5. Plank, J. M., Alibay, Z., Ngo-Duc, T. T., Lai, M., Mayes, E. A. S., et al. (2020) Bifunctional M13 bacteriophage nanospheroids for the synthesis of hybrid noncentrosymmetric nanoparticles, *ACS Appl. Nano Mater.*, **3**, 10668-10677, doi: 10.1021/acsanm.0c01876.
6. Ngo-Duc, T. T., Alibay, Z., Plank, J. M., Cheeney, J. E., and Haberer, E. D. (2020) Gold-decorated M13 I-forms and S-forms for targeted photothermal lysis of bacteria, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **12**, 126-134, doi: 10.1021/acsaami.9b15682.
7. Kovalenko, A. O., Ryabchevskaya, E. M., Evtushenko, E. A., Manukhova, T. I., Kondakova, O. A., et al. (2022) Vaccine candidate against COVID-19 based on structurally modified plant virus as an adjuvant, *Front. Microbiol.*, **13**, 1-15, doi: 10.3389/fmicb.2022.845316.
8. Ryabchevskaya, E. M., Granovskiy, D. L., Evtushenko, E. A., Ivanov, P. A., Kondakova, O. A., et al. (2022) Designing stable bacillus anthracis antigens with a view to recombinant anthrax vaccine development, *Pharmaceutics*, **14**, 806, doi: 10.3390/pharmaceutics14040806.
9. Manning, M., Chrysogelos, S., and Griffith, J. (1981) Mechanism of coliphage M13 contraction: intermediate structures trapped at low temperatures, *J. Virol.*, **40**, 912-919, doi: 10.1128/JVI.40.3.912-919.1981.
10. Atabekov, J., Nikitin, N., Arkhipenko, M., Chirkov, S., and Karpova, O. (2011) Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles, *J. Gen. Virol.*, **92**, 453-456, doi: 10.1099/vir.0.024356-0.
11. Nikitin, N., Ksenofontov, A., Trifonova, E., Arkhipenko, M., Petrova, E., et al. (2016) Thermal conversion of filamentous potato virus X into spherical particles with different properties from virions, *FEBS Lett.*, **590**, 1543-1551, doi: 10.1002/1873-3468.12184.
12. Manukhova, T. I., Evtushenko, E. A., Ksenofontov, A. L., Arutyunyan, A. M., Kovalenko, A. O., et al. (2021) Thermal remodelling of Alternanthera mosaic virus virions and virus-like particles into protein spherical particles, *PLoS One*, **16**, e0255378, doi: 10.1371/journal.pone.0255378.
13. Hart, R. G. (1956) Morphological changes accompanying thermal denaturation of tobacco mosaic virus, *Biochim. Biophys. Acta*, **20**, 388-389.
14. Bruckman, M. A., Yu, X., and Steinmetz, N. F. (2013) Engineering Gd-loaded nanoparticles to enhance MRI sensitivity via T(1) shortening, *Nanotechnology*, **24**, 462001, doi: 10.1088/0957-4484/24/46/462001.
15. Bruckman, M. A., Randolph, L. N., VanMeter, A., Hern, S., Shoffstall, A. J., Taurog, R. E., et al. (2014) Biodistribution, pharmacokinetics, and blood compatibility of native and PEGylated tobacco mosaic virus nano-rods and -spheres in mice, *Virology*, **449**, 163-173, doi: 10.1016/j.virol.2013.10.035.
16. Bruckman, M. A., and Steinmetz, N. F. (2014) Chemical modification of the inner and outer surfaces of Tobacco Mosaic Virus (TMV), *Methods Mol. Biol.*, **1108**, 173-185, doi: 10.1007/978-1-62703-751-8_13.
17. Bruckman, M. A., Jiang, K., Simpson, E. J., Randolph, L. N., Luyt, L. G., et al. (2014) Dual-modal magnetic resonance and fluorescence imaging of atherosclerotic plaques in vivo using VCAM-1 targeted tobacco mosaic virus, *Nano Lett.*, **14**, 1551-1558, doi: 10.1021/nl404816m.

18. Bruckman, M. A., Randolph, L. N., Gulati, N. M., Stewart, P. L., et al. (2015) Silica-coated Gd(DOTA)-loaded protein nanoparticles enable magnetic resonance imaging of macrophages, *J. Mater. Chem. B*, **3**, 7503-7510, doi: 10.1039/C5TB01014D.
19. Bruckman, M. A., VanMeter, A., and Steinmetz, N. F. (2015) Nanomanufacturing of Tobacco Mosaic virus-based spherical biomaterials using a continuous flow method, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **1**, 13-18, doi: 10.1021/ab500059s.
20. Wu, Y., Zhao, X., Hu, J., Lin, Y., and Wang, Q. (2017) Preparation and characterization of functional Tobacco Mosaic virus spherical nanoparticles, *Chinese J. Appl. Chem.*, **34**, 379-384, doi: 10.11944/j.issn.1000-0518.2017.04.160302.
21. Rodríguez-Galván, A., Martínez-Loran, E., Naveja, J. J., Ornelas-Soto, N., Basiuk, V., et al. (2017) *In situ* metallization of thermally-treated tobacco mosaic virus using silver nanoparticles, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **17**, 4740-4747, doi: 10.1166/jnn.2017.13714.
22. Murray, A. A., Wang, C., Fiering, S., and Steinmetz, N. F. (2018) *In situ* vaccination with Cowpea vs Tobacco Mosaic Virus against melanoma, *Mol. Pharm.*, **15**, 3700-3716, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00316.
23. Трифонова Е. А., Никитин Н. А., Архипенко М. В., Донченко Е. К., Атабеков И. Г., и др. (2017) Сравнительное изучение термической перестройки вирусов с икосаэдрическим и спиральным типом симметрии, *Вестник МГУ, Серия 16, Биология*, **4**, 209-214.
24. Griffith, J., Manning, M., and Dunn, K. (1981) Filamentous bacteriophage contract into hollow spherical particles upon exposure to a chloroform-water interface, *Cell*, **23**, 747-753, doi: 10.1016/0092-8674(81)90438-4.
25. Butler, P. J. (1999) Self-assembly of tobacco mosaic virus: The role of an intermediate aggregate generating both specificity and speed, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **354**, 537-550, doi: 10.1098/rstb.1999.0405.
26. Lomonosoff, G. P., and Wege, C. (2018) TMV particles: the journey from Fundamental studies to bionanotechnology applications, *Adv. Virus. Res.*, **102**, 149-176, doi: 10.1016/bs.aivir.2018.06.003.
27. Никитин Н. А., Малинин А. С., Рахнянская А. А., Трифонова Е. А., Карпова О. В., и др. (2011) Использование поликатионного спейсера для нековалентной иммобилизации альбумина на термически модифицированных вирусных частицах, *Высокомолекулярные соединения, Серия А*, **53**, 1885-1891.
28. Dobrov, E. N., Nikitin, N. A., Trifonova, E. A., Parshina, E. Y., Makarov, V. V., et al. (2014) β -structure of the coat protein subunits in spherical particles generated by tobacco mosaic virus thermal denaturation, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **32**, 701-708, doi: 10.1080/07391102.2013.788983.
29. Nikitin, N., Trifonova, E., Karpova, O., and Atabekov, J. (2013) Examination of biologically active nanocomplexes by nanoparticle tracking analysis, *Microsc. Microanal.*, **19**, 808-813, doi: 10.1017/S1431927613000597.
30. Nikitin, N. A., Malinin, A. S., Trifonova, E. A., Rakhnyanskaya, A. A., Yaroslavov, A. A., et al. (2014) Proteins immobilization on the surface of modified plant viral particles coated with hydrophobic polycations, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **25**, 1743-1754, doi: 10.1080/09205063.2014.946877.
31. Ksenofontov, A. L., Fedorova, N. V., Badun, G. A., Serebryakova, M. V., Nikitin, N. A., et al. (2019) Surface characterization of the thermal remodeling helical plant virus, *PLoS One*, **14**, e0216905, doi: 10.1371/journal.pone.0216905.
32. Трифонова Е. А., Никитин Н. А., Кирпичников М. П., Карпова О. В., Атабеков И. Г. (2015) Способ получения и характеристика сферических частиц — новых биогенных платформ, *Вестник МГУ, Серия 16, Биология*, **4**, 46-50.
33. Trifonova, E. A., Nikitin, N. A., Gmyl, A. P., Lazareva, E. A., Karpova, O. V., et al. (2014) Complexes assembled from TMV-derived spherical particles and entire virions of heterogeneous nature, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **32**, 1193-1201, doi: 10.1080/07391102.2013.816868.
34. Evtushenko, E. A., Ryabchevskaya, E. M., Nikitin, N. A., Atabekov, J. G., and Karpova, O. V. (2020) Plant virus particles with various shapes as potential adjuvants, *Sci. Rep.*, **10**, 10365, doi: 10.1038/s41598-020-67023-4.
35. Ryabchevskaya, E. M., Evtushenko, E. A., Granovskiy, D. L., Ivanov, P. A., Atabekov, J. G., et al. (2021) Two approaches for the stabilization of *Bacillus anthracis* recombinant protective antigen, *Hum. Vaccine Immunother.*, **17**, 560-565, doi: 10.1080/21645515.2020.1772632.
36. Phillips, B., Van Rompay, K., Rodriguez-Nieves, J., Lorin, C., Koutsoukos, M., et al. (2018) Adjuvant-dependent enhancement of HIV Env-specific antibody responses in infant rhesus macaques, *J. Virol.*, **92**, e01051-18, doi: 10.1128/JVI.01051-18.
37. Wang, Z. B., and Xu, J. (2020) Better adjuvants for better vaccines: Progress in adjuvant delivery systems, modifications, and adjuvant-antigen codelivery, *Vaccines*, **8**, 128, doi: 10.3390/vaccines8010128.
38. Kurashova, S. S., Ishmukhametov, A. A., Dzagurova, T. K., Egorova, M. S., Balovneva, M. V., et al. (2020) Various adjuvants effect on immunogenicity of Puumala Virus Vaccine, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **10**, 545371, doi: 10.3389/fcimb.2020.545371.
39. Danielsson, R., and Eriksson, H. (2021) Aluminium adjuvants in vaccines — a way to modulate the immune response, *Semin. Cell Dev. Biolol.*, **115**, 3-9, doi: 10.1016/j.semcdb.2020.12.008.
40. Рябчевская Е. М., Евтушенко Е. А., Архипенко М. В., Манухова Т. И., Донченко Е. К., и др. (2020) Новый подход к разработке кандидатной вакцины против ротавируса на основе двух вирусов растений, *Сельхоз. биол.*, **55**, 1004-1017,

- doi: 10.15389/agrobiology.2020.5.1004rus.
41. Кондакова О. А., Трифонова Е. А., Архипенко М. В., Никитин Н. А., Карпова О. В., и др. (2017) Разработка вакцины против птичьего гриппа на основе структурно модифицированных вирусов растений, *Сельхоз. биол.*, **52**, 731-738, doi: 10.15389/agrobiology.2017.4.731rus.
 42. Nikitin, N. A., Matveeva, I. N., Trifonova, E. A., Puhova, N. M., Samuylenko, A. Y., et al. (2018) Spherical particles derived from TMV virions enhance the protective properties of the rabies vaccine, *Data Brief*, **21**, 742-745, doi: 10.1016/j.dib.2018.10.030.
 43. Kondakova, O. A., Nikitin, N. A., Evtushenko, E. A., Ryabchevskaya, E. M., Atabekov, J. G., et al. (2019) Vaccines against anthrax based on recombinant protective antigen: Problems and solutions, *Expert Rev. Vaccines*, **18**, 813-828, doi: 10.1080/14760584.2019.1643242.
 44. Кондакова О. А., Никитин Н. А., Евтушенко Е. А., Грановский Д. Л., Атабеков И. Г., и др. (2021) Сибирская язва: жизненный цикл, механизмы патогенеза и новые концепции в развитии ветеринарных вакцин, *Сельхоз. Биол.*, **56**, 415-433, doi: 10.15389/agrobiology.2021.3.415rus.
 45. Lizotte, P. H., Wen, A. M., Sheen, M. R., Fields, J., Rojanasopondist, P., et al. (2016) *In situ* vaccination with cowpea mosaic virus nanoparticles suppresses metastatic cancer, *Nat. Nanotechnol.*, **11**, 295-303, doi: 10.1038/nnano.2015.292.
 46. Lebel, M. E., Chartrand, K., Tarrab, E., Savard, P., Leclerc, D., et al. (2016) Potentiating cancer immunotherapy using papaya mosaic virus-derived nanoparticles, *Nano Lett.*, **16**, 1826-1832, doi: 10.1021/acs.nanolett.5b04877.
 47. Lee, K. L., Murray, A. A., Le, D., Sheen, M. R., Shukla, S., et al. (2017) Combination of plant virus nanoparticle-based *in situ* vaccination with chemotherapy potentiates antitumor response, *Nano Lett.*, **17**, 4019-4028, doi: 10.1021/acs.nanolett.7b00107.
 48. Chen, L., Zhao, X., Lin, Y., Huang, Y., and Wang, Q. (2013) A supramolecular strategy to assemble multifunctional viral nanoparticles, *Chem. Commun.*, **49**, 9678-9680, doi: 10.1039/c3cc45559a.
 49. Shah, S., Shah, S., and Heddle, J. (2012) Wild-type tobacco mosaic virus (TMV) as a scaffold for gold nanoparticle fabrication, *Proc. 6th Int. Conf. Gold Sci. Technol. Its Appl.*, 2P-072, Tokyo.
 50. Ksenofontov, A. L., Parshina, E. Y., Fedorova, N. V., Arutyunyan, A. M., Rumvold, R., et al. (2016) Heating-induced transition of Potyvirus Potato Virus A coat protein into β -structure, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **34**, 250-258, doi: 10.1080/07391102.2015.1022604.
 51. Никитин Н. А., Трифонова Е. А., Карпова О. В., Атабеков И. Г. (2016) Биобезопасность вирусов растений для человека и животных, *Вестник МГУ, Серия 16, Биология*, **3**, 20-26.
 52. Nkanga, C. I., and Steinmetz, N. F. (2021) The pharmacology of plant virus nanoparticles, *Virology*, **556**, 39-61, doi: 10.1016/j.virol.2021.01.012.
 53. Nikitin, N. A., Zenin, V. A., Trifonova, E. A., Ryabchevskaya, E. M., Kondakova, O. A., et al. (2018) Assessment of structurally modified plant virus as a novel adjuvant in toxicity studies, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **97**, 127-133, doi: 10.1016/j.yrtph.2018.06.010.
 54. Nikitin, N. A., Zenin, V. A., Trifonova, E. A., Ryabchevskaya, E. M., Yurkova, M.S., et al. (2018) Data in support of toxicity studies of structurally modified plant virus to safety assessment, *Data Brief*, **21**, 1504-1507, doi: 10.1016/j.dib.2018.10.102.
 55. Ngo-Duc, T. T., Zaman, M. S., Moon, C. H., and Haberer, E. D. (2014) Morphology manipulation of M13 bacteriophage template for nanostructure assembly, *Proc. SPIE*, **9171**, 91710X, doi: 10.1117/12.2062417.
 56. Rakonjac, J., Russel, M., Khanum, S., Brooke, S. J., and Rajič, M. (2017) Filamentous phage: structure and biology, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1053**, 1-20, doi: 10.1007/978-3-319-72077-7_1.
 57. Lopez, J., and Webster, R. E. (1982) Minor coat protein composition and location of the A protein in bacteriophage f1 spheroids and I-forms, *J. Virol.*, **42**, 1099-1107, doi: 10.1128/JVI.42.3.1099-1107.1982.
 58. Olsen, E. V., Sykora, J., Sorokulova, I., Neely, W., Petrenko, V., et al. (2007) Phage fusion proteins as bioselective receptors for piezoelectric sensors, *ECS Transact.*, **2**, 9-25, doi: 10.1149/1.2408983.
 59. Ngo-Duc, T. T., Plank, J. M., Chen, G., Harrison, R. E., Morikis, D., et al. (2018) M13 bacteriophage spheroids as scaffolds for directed synthesis of spiky gold nanostructures, *Nanoscale*, **10**, 13055-13063, doi: 10.1039/C8NR03229G.
 60. Madkour, M., and Sagheer, F. A. (2017) Au/ZnS and Ag/ZnS nanoheterostructures as regenerated nanophotocatalysts for photocatalytic degradation of organic dyes, *Opt. Mater. Express*, **7**, 158-169, doi: 10.1364/OME.7.000158.
 61. Passaretti, P., Khan, I., Dafforn, T. R. Oppenheimer, P. G. (2020) Improvements in the production of purified M13 bacteriophage bio-nanoparticle, *Sci. Rep.*, **10**, 18538, doi: 10.1038/s41598-020-75205-3.
 62. Shukla, S., Hu, H., Cai, H., Chan, S. K., Boone, C. E., et al. (2020) Plant viruses and bacteriophage-based reagents for diagnosis and therapy, *Annu. Rev. Virol.*, **7**, 559-587, doi: 10.1146/annurev-virology-010720-052252.
 63. Chung, Y. H., Cai, H., and Steinmetz, N. F. (2020) Viral nanoparticles for drug delivery, imaging, immunotherapy, and theranostic applications, *Adv. Drug Del. Rev.*, **156**, 214-235, doi: 10.1016/j.addr.2020.06.024.
 64. Balke, I., and Zeltins, A. (2019). Use of plant viruses and virus-like particles for the creation of novel vaccines, *Adv. Drug Del. Rev.*, **145**, 119-129, doi: 10.1016/j.addr.2018.08.007.

STRUCTURALLY MODIFIED PLANT VIRUSES AND BACTERIOPHAGES. PROPERTIES AND APPLICATIONS

Review

O. A. Kondakova, E. A. Evtushenko*, O. A. Baranov, N. A. Nikitin, and O. V. Karpova

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; e-mail: trifonova.katerina@gmail.com*

Structurally modified particles obtained by thermal or chemical treatment of rod-shaped or filamentous virions of plant viruses and bacteriophages have recently earned close attention of researchers as promising biogenic particles for design new biotechnologies. This review presents data on the preparation, structure, and properties of structurally modified particles, including their biosafety for animals, as well as the same areas of application of these particles in biomedicine. A special section is devoted to one of the most relevant and promising areas for the use of structurally modified plant viruses – the development of vaccine.

Keywords: structurally modified viruses, spherical particles, plant viruses, bacteriophages, vaccines, biotechnology, biomedicine

УДК 577.25

25-ГИДРОКСИХОЛЕСТЕРИН КАК СИГНАЛЬНАЯ МОЛЕКУЛА В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

Обзор

© 2022 Ю.Г. Одношивкина^{1,2#}, Е.А. Кузнецова^{1#}, А.М. Петров^{1,2*}

¹ Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ КазНЦ РАН,
Лаборатория биофизики синаптических процессов,
420111 Казань, Россия; электронная почта: alexey.petrov@kazangmu.ru

² Казанский медицинский университет, 420012 Казань, Россия

Поступила в редакцию 25.03.2022

После доработки 10.05.2022

Принята к публикации 10.05.2022

Холестерин — важный компонент плазматических мембран и предшественник ряда биологически активных соединений, в том числе гидроксихолестеринов (ГХ). Последние контролируют ключевые звенья клеточного гомеостаза холестерина. ГХ, проникая через мембранные и сосудистые барьеры, могут оказывать дистанционное действие, выступая в роли пара- и эндокринных агентов. 25-ГХ в небольших количествах образуется в эндоплазматической сети многих клеток и является мощным локальным регулятором синтеза холестерина, его внутриклеточного транспорта и депонирования. При запуске воспалительных реакций продукция 25-ГХ значительно возрастает в макрофагах, дендритных клетках и микроглии. Также синтез 25-ГХ может повышаться при ряде неврологических заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, спастическая параплегия 5-го типа и X-сцепленная адренолейкодистрофия. При этом пока не известно, в каких случаях 25-ГХ может усиливать патологию, а когда — обладать протекторными свойствами. Молекулярными мишенями для действия 25-ГХ являются некоторые транскрипционные факторы (LX-рецепторы, SREBP2, ROR), сопряженный с G-белком рецептор (GPR183), ионные каналы (NMDA-рецепторы, SLO1), молекулы адгезии ($\alpha 5 \beta 1$ - и $\alpha v \beta 3$ -интегрины), а также оксистерин-связывающие белки. Такое изобилие белков, взаимодействующих с 25-ГХ, предполагает наличие у данного ГХ способности принимать участие во многих физиологических и патологических процессах. В представленном обзоре мы сфокусировались на регуляции продукции 25-ГХ и его универсальной роли в контроле клеточного гомеостаза холестерина, а также на эффектах 25-ГХ как сигнальной молекулы, опосредующей влияние воспаления на процессы в нервно-мышечной системе и мозге. Исходя из накопившихся данных следует заключить, что 25-ГХ препятствует накоплению клеточного холестерина и выступает в качестве мощного модулятора нейровоспаления, синаптической передачи и миелинизации. Его усиленная продукция в ответ на широкий спектр «нарушений» может выполнять протективную роль, ограничивая гибель нейронов. Тем не менее сверхвысокие концентрации 25-ГХ оказывают нейротоксическое действие.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: холестерин, 25-гидроксихолестерин, LX-рецепторы, NMDA-рецепторы, синаптическая передача, нейровоспаление, микроглия.

DOI: 10.31857/S0320972522060045, **EDN:** AUEOFZ

ВВЕДЕНИЕ

Холестерин — основной структурный компонент плазматической мембраны, который контролирует текучесть и толщину мембран.

Холестерин организует в мембране микродомены, липидные рафты, в которых сосредоточены многие рецепторы, ионные каналы и сигнальные ферменты. Стероидные гормоны, желчные кислоты и нейростероиды синтези-

Принятые сокращения: ГХ — гидроксихолестерин; ИНФ — интерферон; ЛПС — липополисахарид; МКС — мембранные контактные сайты; ЭПС — эндоплазматическая сеть; ЭР — эстрогеновый рецептор; CH25H — холестерин 25-гидроксилаза; HMGCR — 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А редуктаза; LX-рецепторы — печеночные X-рецепторы; TLR4 — толл-подобный рецептор 4.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

руются из холестерина. Также холестерин выступает предшественником многочисленных окисленных форм холестерина (оксистериннов), часть из которых выполняет важные сигнальные функции и контролирует синтез самого холестерина, в том числе в мозге и сетчатке, которые в значительной степени отключены от системного гомеостаза холестерина [1].

Холестерин может окисляться до различных форм оксистериннов, концентрация которых неодинакова. Один из оксистериннов, 25-гидроксихолестерин (25-ГХ), вызывает особый интерес. Во-первых, он синтезируется при участии специфического фермента эндоплазматической сети (ЭПС), холестерин-25-гидроксилазы (*CH25H*) [2]. Экспрессия гена *CH25H* в норме низкая и увеличивается в десятки раз в ходе воспалительных реакций [3], в том числе сопровождающих нейродегенеративные заболевания [4, 5]. Во-вторых, главные клетки продуценты 25-ГХ — это макрофаги, дендритные клетки и микроглия [3, 4]. Особенно интенсивно 25-ГХ могут синтезировать альвеолярные макрофаги [6]. В-третьих, мишенями действия 25-ГХ являются некоторые сопряженные с G-белками рецепторы, транскрипционные факторы, адгезивные молекулы и ионные каналы [3, 7–10]. Кроме того, 25-ГХ, как ГХ с гидроксильной группой в боковой цепи, способен проникать не только через плазматические мембраны, но и сквозь сосудистые барьеры [11]. Последнее свойство создает предпосылки для дистанционного действия ГХ в качестве пара- и (или) эндокринного фактора [12].

РЕГУЛЯЦИЯ ПРОДУКЦИИ 25-ГИДРОКСИХОЛЕСТЕРИНА

Образование 25-ГХ определяется в значительной степени содержанием *CH25H* в клетках (рис. 1). Многочисленные исследования показали, что провоспалительные цитокины могут сильно повышать экспрессию *CH25H* [3]. В частности, *CH25H* относят к семейству интерферон-стимулируемых генов. Активация рецепторов к интерферону (ИНФ) приводит к сборке комплекса (из транскрипционных факторов STAT1 и STAT2), который усиливает экспрессию *CH25H* в макрофагах в ~ 30 раз, в дендритных клетках — в ~ 10 раз [13]. Интересно, что 25-ГХ может подавлять перемещение рецептора ИНФ γ в липидные рафты в микроглии и подавлять вызванную ИНФ γ про-

воспалительную активацию микроглии [14]. Следовательно, под влияем ИНФ увеличивается продукция 25-ГХ, который подавляет передачу сигналов через рецепторы к ИНФ, т.е. формируется отрицательная обратная связь, ограничивающая действие ИНФ. Интересно отметить, что повышенная экспрессия генов, связанных с метаболизмом холестерина (в том числе *CH25H*) характерна для Trem2⁺ микроглии, обладающей протекторными свойствами при нейродегенеративных и демиелинизирующих заболеваниях [15].

Повышение уровня 25-ГХ в плазме происходит не только при вирусных, но и бактериальных угрозах. Липополисахарид (ЛПС) бактериальной стенки, стимулируя толл-подобный рецептор 4 (TLR4), увеличивает экспрессию *CH25H* примерно в 35 и 65 раз в макрофагах [21] и микроглии [4] соответственно. Аналогично, инъекции селективного агониста TLR4 повышают содержание *CH25H* через 8–12 ч в печени (~250 раз), сердце (~50 раз), мозге (~30 раз), легких (~20 раз), мышцах, почках и тимусе (8–12 раз), а также в 3–5 раз — в коже и кишечнике, что указывает на реакцию резидентных макрофагов многих тканей [22]. Экспрессия *CH25H* может усиливаться под действием транскрипционного фактора KLF4, регулирующего воспаление и апоптоз, и активируемого при стимуляции рецепторов ряда цитокинов [16]. Инъекция ЛПС увеличивает образование *KLF4* в микроглиальных клетках, где KLF4 взаимодействует с транскрипционным фактором NF κ B, одним из ключевых регуляторов провоспалительных генов [23]. KLF4 способствует изменению фенотипа микроглии и макрофагов в направлении из провоспалительного M1- в противовоспалительный M2-вариант [24, 25]. В макрофагах показано, что KLF4 повышает экспрессию печеночных X-рецепторов (LX-рецепторов) [16]. Последние — важные регуляторы воспалительного ответа и метаболизма липидов, в том числе холестерина. Более того, 25-ГХ является лигандом LX-рецепторов: через их активацию 25-ГХ способен усилить выработку *CH25H* в макрофагах и, следовательно, синтез 25-ГХ [18]. Таким путем формируется положительная обратная связь, направленная на лавинообразное увеличение уровня 25-ГХ. Причем стимуляция LX-рецепторов 25-ГХ важна для перехода макрофагов в M2-состояние [26].

Повышенная активность *CH25H* наблюдается при ряде заболеваний, сопровождаемых

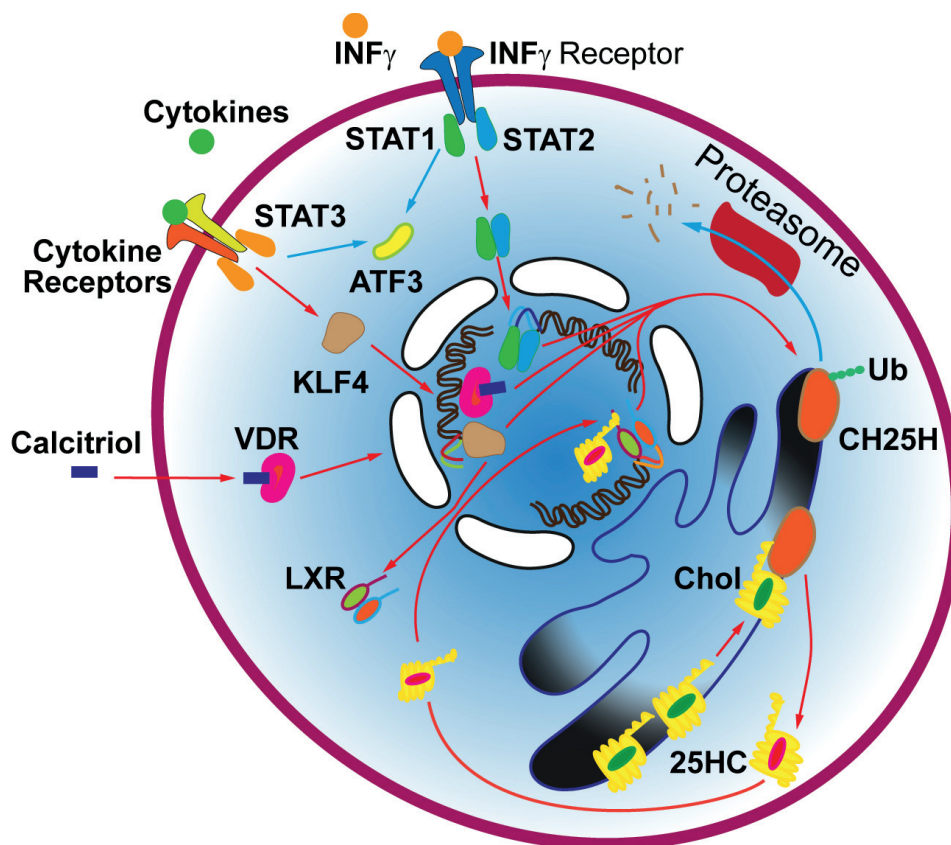


Рис. 1. Регуляция экспрессии *CH25H*. ИНФ γ (INF γ) и ряд цитокинов через стимуляцию транскрипционных факторов STAT и KLF4 увеличивают экспрессию *CH25H* [13, 16], а через активацию ATF3 могут оказывать обратный эффект [17]. Экспрессия *CH25H* усиливается при стимуляции рецептора витамина D (VDR) и печеночных X-рецепторов (LXR) [18, 19]. Лигандом для последних является сам 25-ГХ (25HC), таким образом, формируется положительная обратная связь между экспрессией *CH25H* и продукцией 25-ГХ. Синтез 25-ГХ увеличивается при повышении содержания холестерина (Chol) в эндоплазматической сети. Наоборот, убиквитинирование (Ub) *CH25H* направляет фермент на деградацию в протеасомы, что ведет к снижению синтеза 25-ГХ [20]. Синие и красные стрелки показывают регуляцию, направленную на уменьшение и повышение уровня 25-ГХ соответственно

хронических воспалением, в том числе нейровоспалением. Например, увеличение экспрессии *CH25H* в микроглиальных клетках было обнаружено в моделях болезни Альцгеймера [27], X-сцепленной адренолейкодистрофии [28] и лейкоэнцефалопатии у взрослых с аксональными сфероидомиями и пигментированной глией [29]. Концентрация 25-ГХ может значительно повышаться при боковом амиотрофическом склерозе [5, 30] и спастической параплегии 5 типа [31] — патологиях, поражающих двигательные нейроны.

Безусловно, при воспалительных реакциях существует и негативная регуляция содержания *CH25H*. Экспрессия *CH25H* подавляется транскрипционным фактором ATF3 [17], который активируется при повышении уровня ряда цитокинов и интерферонов. Активация

этого фактора в микроглии происходит при повреждении нервов и важна для их регенерации [32]. Убиквитинирование *CH25H* направляет фермент на деградацию в протеасомы. Вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней, усиливая убиквитинирование и протеолиз *CH25H*, угнетает синтез 25-ГХ, обладающего противовирусными свойствами [20]. Уровень 25-ГХ снижается у пациентов при поражении COVID-19, что сопровождается цитокиновым штормом, который способна снизить доставка 25-ГХ в нановезикулах [33].

Диета влияет на уровень *CH25H* и продукцию 25-ГХ. Образование 25-ГХ относительно быстро усиливается после потребления богатой холестерином пищи [34]. Экспрессия *CH25H*, как и продукция 25-ГХ, повышается макрофагами жировой ткани при увеличении

индекса массы тела и диете, обогащенной жирами [35]. Потребление избытка арахидоновой кислоты может увеличивать уровень СН25Н в печени и мозге [36]. У пациентов с дефицитом витамина D показано, что концентрация 25-ГХ в плазме значительно повышается при употреблении витамина D (8 недель, 50 000 МЕ в неделю) в сочетании с фототерапией [37]. Вероятно, это связано с тем, что витамин D, мишенями которого являются ядерные рецепторы, может повышать экспрессию СН25Н. Более того, антипролиферативное действие витамина D зависит от СН25Н и опосредуется 25-ГХ [19]. Активация рецепторов витамина D может подавлять нейровоспаление и нарушение гематоэнцефалического барьера, а также усиливать миелинизацию [38]. При этом микроглиальные рецепторы витамина D способствуют поляризации клеток в направлении М2-фенотипа [39]. Возможно, 25-ГХ играет роль в этих нейропротекторных эффектах витамина D.

Следует отметить, что хотя ключевым ферментом в образовании 25-ГХ является СН25Н, некоторые цитохромы (СYP) в качестве «побочного» продукта также могут генерировать 25-ГХ. В частности, митохондриальный СYP27A1, а также микросомальные СYP46A1 и СYP3A могут синтезировать 25-ГХ [40].

ГОМЕОСТАТИЧЕСКАЯ РОЛЬ 25-ГИДРОКСИХОЛЕСТЕРИНА КАК ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО РЕГУЛЯТОРА

В последние годы опубликован ряд детальных обзоров о клеточном гомеостазе холестерина [41, 42]. В этой главе мы хотим акцентировать внимание только на значение эндогенной продукции 25-ГХ для контроля содержания холестерина в клетке. Безусловно, многие оксистерины способны вмешиваться в гомеостаз холестерина. Однако 25-ГХ обладает, вероятно, самым сильным действием, даже несмотря на то что в физиологических условиях клетки экспрессируют СН25Н на низком уровне [2]. Это связано со свойствами самого 25-ГХ и с расположением СН25Н в ЭПС — ключевом регионе синтеза холестерина (здесь локализируются около 20 ферментов биосинтетического пути холестерина). Также в ЭПС находятся главные компоненты механизма, управляющего гомеостазом холестерина, а постоянный «отток» холестерина (за счет транспорта в дру-

гие мембраны и депонирования в виде эфиров в липидных каплях) обеспечивает его низкий уровень (3–6%) в ЭПС по сравнению с другими мембранами [43].

Повышение содержания холестерина в ЭПС (вследствие избыточного синтеза и (или) снижения оттока) ведет к его 25-гидроксилированию. Следовательно, накопление 25-ГХ отражает избыток холестерина в клетках, что имеет пагубные последствия, в том числе для нейронов и микроглии [1, 15]. Поэтому неудивительно, что 25-ГХ запускает механизмы, направленные на снижение клеточного уровня холестерина (рис. 2).

Во-первых, 25-ГХ стимулирует связывание белка INSIG1/2 с 3-гидрокси-3-метил-глутарил коэнзим А редуктазой (HMGCR) — ферментом, лимитирующим скорость синтеза холестерина. В результате HMGCR убиквитинируется и направляется из ЭПС на деградацию в протеасомы [44]. Связываясь с INSIG, 25-ГХ способствует удержанию комплекса SCAP-SREBP2-INSIG в ЭПС, препятствуя тем самым активации транскрипционного фактора SREBP2, усиливающего экспрессию ферментов биосинтетического пути холестерина [45, 46]. Таким образом, повышение уровня 25-ГХ в ЭПС приводит к снижению содержания ферментов, участвующих в синтезе холестерина за счет усиления их деградации и снижения экспрессии. 25-ГХ в субмикромольной концентрации препятствует активации SREBP2 в культивируемых нейронах, угнетая экспрессию ферментов синтеза холестерина [47]. Блокирование процессинга транскрипционного фактора SREBP под влиянием 25-ГХ также препятствует экспрессии противовоспалительных цитокинов [48].

Другой механизм, с помощью которого 25-ГХ может снижать клеточный уровень холестерина, определяется его способностью активировать ядерные LX-рецепторы, контролирующие гены транспорта липидов [3, 42]. Стимуляция LX-рецепторов увеличивает экспрессию ABC-транспортеров (ABCA1, ABCG1, ABCG5 и ABCG8), ответственных за реверсивный транспорт холестерина из клетки на внеклеточные акцепторы (например, APOA-I или APOE). Также активация LX-рецепторов способствует образованию убиквитинлигазы IDOL, которая убиквитинирует рецептор липопротеина низкой плотности (LDL), способствуя его деградации [49, 50]. В итоге снижается захват внеклеточного холестерина в ходе

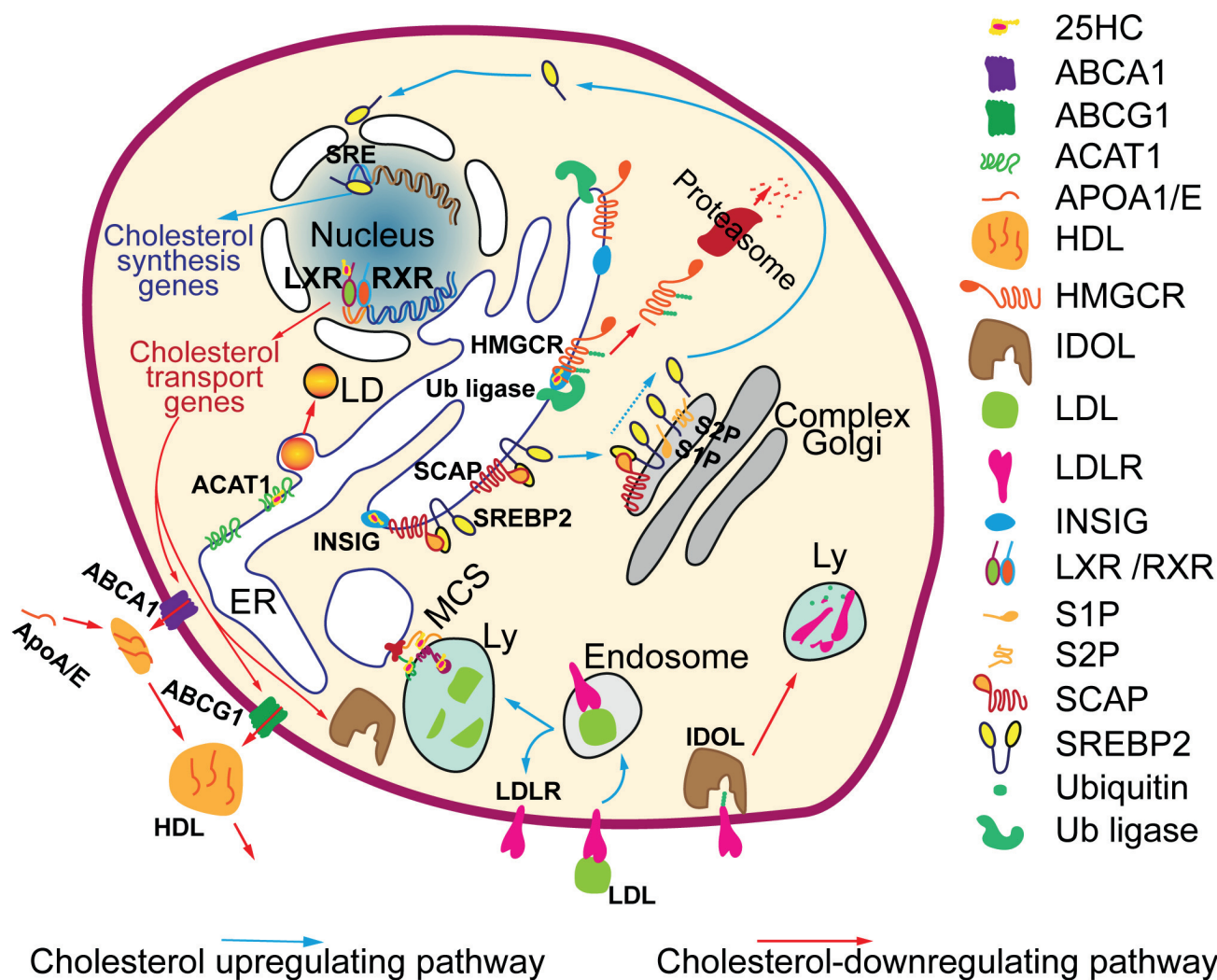


Рис. 2. Зависимая от 25-ГХ регуляция клеточного гомеостаза холестерина. Избыток холестерина превращается в 25-ГХ (25HC) в ЭПС (ER), где 25-ГХ связывается с INSIG. (1) INSIG-25-ГХ способствует удержанию комплекса SCAP и SREBP2 в ЭПС. В отсутствие 25-ГХ комплекс SCAP-SREBP2 перемещается в аппарат Гольджи, где SREBP2 подвергается протеолитическому расщеплению протеазами S1P и S2P с освобождением активного транскрипционного фактора SREBP2. Последний связывается с регуляторными регионами генов (SRE) биосинтеза холестерина, повышая их экспрессию [45, 46]. (2) В присутствии 25-ГХ INSIG связывается с убиквитинлигазами, что способствует убиквитинированию фермента HMGCR, лимитирующего скорость синтеза холестерина. Затем убиквитинированный фермент направляется в протеасомы для деградации [44]. 25-ГХ стимулирует LX-рецепторы (LXRs) [3, 42], которые повышают экспрессию генов ABC-транспортеров (ABCA1, ABCG1) и убиквитинлигазы IDOL [49, 50]. (3) ABC-транспортеры перемещают клеточный холестерин на APO-A/E белки, опосредуя формирование и созревание липопротеиновой частицы (HDL) [42]. (4) IDOL, убиквитинируя LDL-рецептор (LDLR), способствует его перемещению в лизосомы (Ly) для протеолиза; в итоге снижается опосредуемый LDL-рецептором захват внеклеточного холестерина [49]. (5) 25-ГХ, взаимодействуя с белками, формирующими мембранные контактные сайты (MCS), может снижать транспорт холестерина между органеллами [41, 51, 52]. (6) 25-ГХ напрямую активирует ACAT1-зависимую этерификацию холестерина в ЭПС, способствуя депонированию избытка холестерина в липидных каплях (LD) [47, 53]. Синие и красные стрелки обозначают регуляцию, направленную на увеличение и уменьшение уровня холестерина соответственно. HDL- липопротеин высокой плотности; LDL – липопротеин низкой плотности; RXR - ретиноидный X-рецептор. Эти пути подавляются и потенцируются 25-ГХ

рецептор-опосредованного эндоцитоза липопротеиновых частиц. Следовательно, повышение уровня 25-ГХ в цитоплазме и ядре (т.е. за пределами места его синтеза) через стиму-

ляцию LX-рецепторов способствует выбросу холестерина из клетки и угнетает захват внеклеточного холестерина. Действительно, 25-ГХ в субмикромольных концентрациях увели-

чивал экспрессию ABCA1 через активацию LX-рецепторов в нейронах и олигодендроцитах [47, 54]. Интересно, что в гипоталамических нейронах IDOL контролирует уровень рецептора к липопротеину очень низкой плотности (VLDL), влияя на потребление пищи и термогенез [55]. Это указывает на возможную роль 25-ГХ в нейрональном контроле метаболических процессов.

25-ГХ влияет на внутриклеточный транспорт холестерина и его депонирование в виде эфиров. 25-ГХ напрямую усиливает активность ацетил-КоА ацетилтрансферазы (ACAT1), ускоряя этерификацию холестерина в ЭПС [53]. Под влиянием 25-ГХ (2,5 и 5 мкМ) в культивируемых нейронах увеличивается (на ~11% и 21% соответственно) образование эфиров холестерина [47]. Перемещение холестерина из лизосом в другие органеллы (ЭПС, пероксисомы, транс-аппарат Гольджи и митохондрии) происходит в значительной степени через мембранные контактные сайты (МКС) невезикулярным путем [41]. Одни из основных компонентов МКС — это оксистерин-связывающие белки (OSBP, ORP1L, ORP2, ORP5, ORP6) и белки, содержащие липид-транспортирующий домен START. 25-ГХ конкурирует с холестерином за связывание с этими белками, тем самым вмешиваясь в доставку холестерина из лизосом [51, 52].

В норме во всех клетках происходит образование небольших количеств 25-ГХ, который предотвращает появление избытка холестерина. При этом в процессе воспалительной реакции 25-ГХ из макрофагов и микроглии может проникать в соседние клетки и нарушать гомеостаз холестерина, препятствуя росту и размножению клеток, а также индуцируя апоптоз. Этот механизм частично лежит в основе антивирусного, антиракового и сенолитического действия 25-ГХ. Следует отметить, что в нейронах, функционирование которых во многих аспектах тесно зависит от холестерина, в ЭПС наряду с 25-ГХ образуется 24-ГХ за счет активности нейрон-специфичного фермента CYP46A1 [1, 56, 57]. Параллельное участие двух ферментов ЭПС, CH25H и CYP46A1, в превращении холестерина в ГХ, вероятно, необходимо для предотвращения накопления холестерина в нейронах. Это особенно важно для нейронов, которые в дополнение к синтезированному *in situ* холестерину получают большую его часть от астроцитов в составе липопротеиновых частиц [1].

25-ГИДРОКСИХОЛЕСТЕРИН КАК МОЛЕКУЛА МЕЖКЛЕТОЧНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

Центральная нервная система ограничена гематоэнцефалическим барьером от системного кровотока. Этот барьер не проницаем для многих молекул, в том числе холестерина. Однако производные холестерина с гидроксильрованием в боковой цепи проникают через сосудистые барьеры [1, 57]. Следовательно, синтезируемый на периферии 25-ГХ (при системном воспалении) может попадать в мозг. С другой стороны, 25-ГХ, образуемый *in situ* в ЦНС, выводится в кровоток. Основным продуцентом 25-ГХ в мозге является активированная микроглия [4, 58]. Периферические «части» нервной системы непосредственно подвержены влиянию 25-ГХ, когда его уровень повышается как локально в ткани, так и системно при воспалительных реакциях или потреблении обогащенной холестерином пищи. Более того, продуценты 25-ГХ, макрофаги, вступают в тесный контакт с периферическими нервами при их повреждении, способствуя регенерации [59]. Таким образом, 25-ГХ может выступать в роли пара- и эндокринной молекулы, которая передает сигнал о воспалении, повреждении или избытке холестерина (рис. 3).

EBI2- и CXCR2-рецепторы. В настоящее время идентифицирован ряд трансмембранных белков, которые выступают в роли высокоаффинных рецепторов для 25-ГХ. Миграция иммунных и глиальных клеток «по градиенту» 25-ГХ и его производного 7 α ,25-диГХ происходит при участии GPR183 (EBI2) — рецептора, сопряженного с G α i-белком. Экспрессия GPR183 глиальными клетками может усиливаться в патологических условиях, а активация GPR183 имеет протективные эффекты. Так, экспрессия GPR183 микроглией увеличивается в очаге эпилептической активности [60]. Стимуляция GPR183 олигодендроцитов вовлечена в ремиелинизацию при моделировании рассеянного склероза [61], а активация GPR183 астроцитов угнетает высвобождение последними провоспалительных цитокинов [62].

Оксистерины могут активировать другой сопряженный с Gi-белком рецептор — CXCR2, важный для миграции клеток в очаг воспаления. В мозге экспрессия CXCR2 в микроглии,

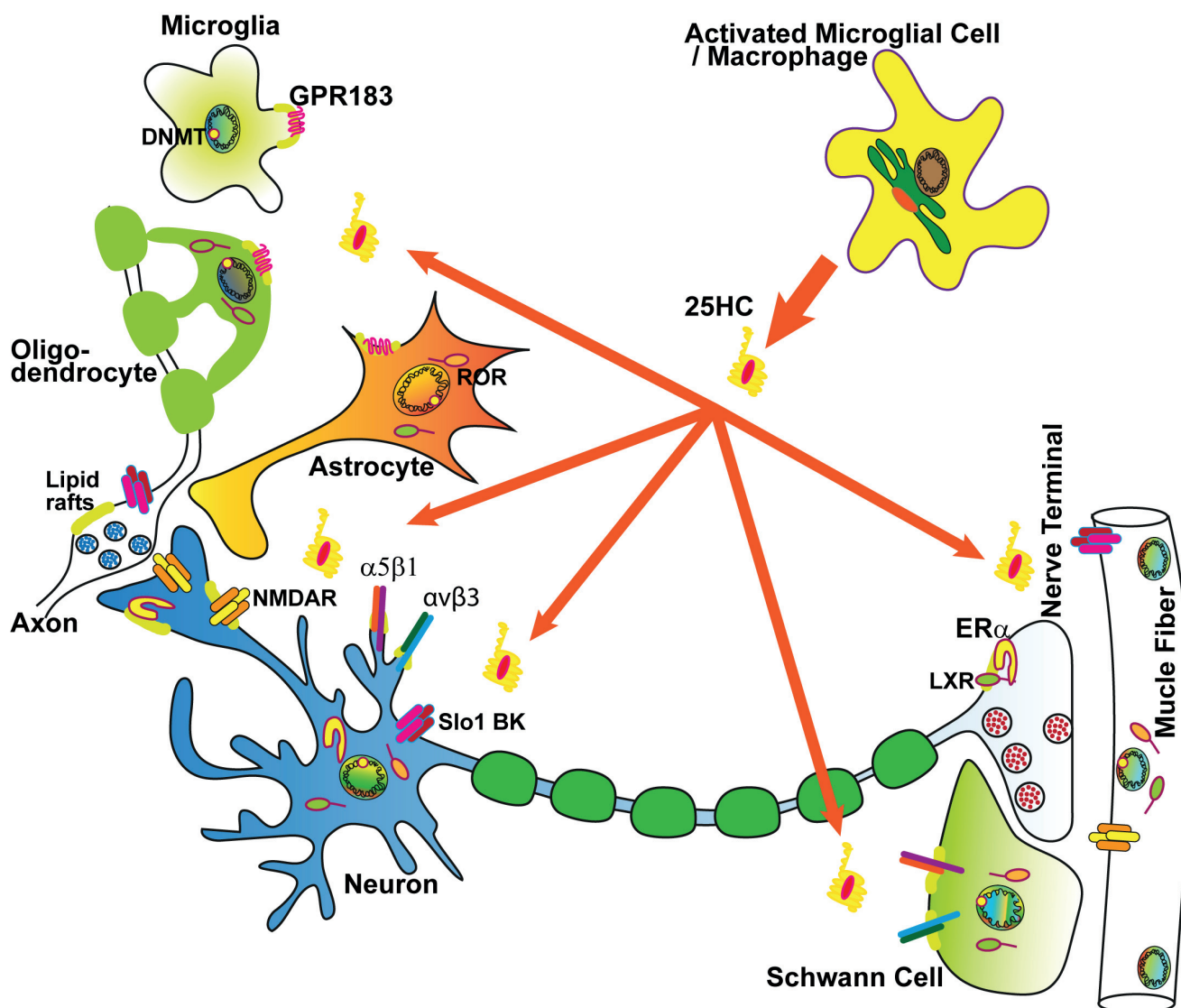


Рис. 3. Основные мишени действия 25-ГХ (25НХ) в нервной системе. Главными продуцентами 25-ГХ являются активированные макрофаги и микроглиальные клетки [3, 4, 58]. Освобождаемый 25-ГХ может влиять на глиальные клетки (микроглию, олигодендроциты, астроциты и Шванновские клетки), а также нейроны. 25-ГХ влияет на синаптическую передачу, действуя на пресинаптические и постсинаптические рецепторы. $\alpha 5\beta 1$ и $\alpha v\beta 3$ - интегрины; DNMT - ДНК-метилтрансфераза; ER α - эстрогеновый рецептор α , GPR183 - сопряженный с G-белком рецептор 183; LXR - LX-рецепторы; NMDAR - NMDA рецепторы; ROR - орфанный рецептор, связанный с ретиноидным X-рецептором; Slo1 BK - потенциал- и кальций-активируемые калиевые каналы большой проводимости. Подробные объяснения в тексте

олигодендроцитах и нейронах повышается при повреждениях, а активация CXCR2 может отрицательно контролировать миелинизацию и нарушать возбуждающую нейротрансдукцию [63, 64]. Однако 25-ГХ (в отличие от 22R-ГХ) в отношении CXCR2 является слабым агонистом даже в высокой концентрации [65].

Интегрины. Миграция и статус иммунных клеток могут регулироваться за счет непосредственного связывания 25-ГХ с адгезивными молекулами, $\alpha 5\beta 1$ - и $\alpha v\beta 3$ -интегринами. В

итоге активируется киназа фокальной адгезии (ФАК) и усиливается продукция цитокинов макрофагами, в частности, фактора некроза опухолей (TNF) и интерлейкина 6 [8]. Следует отметить, что активация $\alpha 5\beta 1$ - и $\alpha v\beta 3$ -интегринов ускоряет рост нейрональных отростков [66, 67], а также пролиферацию и миграцию Шванновских клеток, «покрывающих» периферические нервы и нервно-мышечные синапсы [68, 69]. Потенциально, путь 25-ГХ/интегринов может быть вовлечен в реализацию

положительного действия макрофагов на восстановление поврежденных нервно-мышечных синапсов [59, 70]. При этом следует иметь в виду, что избыточная продукция 25-ГХ, снижая синтез холестерина в Шванновских клетках [71] и экспрессию генов миелина [72], способна ослабить миелинизацию периферических нервов.

NMDA-рецепторы. Другой мишенью 25-ГХ являются глутаматные NMDA-рецепторы, активация которых в ЦНС представляет собой ключевое событие в феноменах синаптической пластичности и памяти. Также эти рецепторы модулируют нейротрансмиттерную передачу на периферии [73]. 25-ГХ непосредственно, хотя и слабо, может усиливать вызванный глутаматом ток через NMDA-рецепторы, но полностью и неконкурентно блокирует мощный потенцирующий эффект 24(S)-ГХ на ионные токи через NMDA-рецепторы [7], в основном содержащие GluN2B субъединицы [74]. В результате 25-ГХ способен снижать вызванное 24(S)-ГХ усиление гибели нервных клеток вследствие гиперактивации NMDA-рецепторов, т.е. эксайтотоксичность. Также 25-ГХ существенно снижает потерю нейронов, вызванную депривацией глюкозы и кислорода [75].

25-ГХ в микромолярной концентрации, как и его избыточная продукция микроглией в ходе нейровоспаления, нарушает в гиппокампе феномен долговременной потенциации, зависящий от NMDA-рецепторов [58]. Однако данное нарушение синаптической пластичности может быть отражением «глобальной» защитной функции 25-ГХ, выделяемого микроглией. Так, 25-ГХ существенно снижал гибель нейронов путем апоптоза, вызванным избыточной экспрессией провоспалительного регулятора STING (стимулятор генов интерферонов) и аутофагией после окклюзии мозговой артерии [76]. 25-ГХ быстро подавляет транспорт рецептора к ИНФγ в липидные рафты и его последующую активацию, в результате снижается продукция провоспалительных цитокинов микроглией [14].

Таким образом, хотя продукция 25-ГХ стимулируется в условиях нейровоспаления, сам он может ограничивать его, выступая ключевым компонентом петли отрицательной обратной связи [48]. При этом он может предотвращать избыточную синаптическую активность в глутаматергических синапсах и нарушать синаптическую пластичность, зависимость от NMDA-рецепторов. Безусловно,

крайне высокие концентрации 25-ГХ, которые используются в клеточных исследованиях [77, 78] или формируются в условиях хронической патологии в мозге, могут иметь и пагубное влияние. Экспрессия CN25H в головном мозге повышена у пациентов с болезнью Альцгеймера, и 25-ГХ может усиливать зависимое от интерлейкина-1β нейровоспаление у модельных APPPS1-21 мышей [4]. Сам β-амилоид в культуре клеток ARPE-19 увеличивал уровень 25-ГХ, способствующего активации P2X7-рецепторов и апоптозу [79]. Схожим образом сверхпродукция 25-ГХ может усиливать нейровоспаление (через активацию NLRP3-инфламмосомы и усиленное образование интерлейкина-1β) при X-сцепленной адренолейкодистрофии — прогрессирующем нейродегенеративном заболевании, связанном с накоплением длинноцепочечных жирных кислот [28].

БК (slo1) каналы. Активность калиевого ионного канала может быть изменена под влиянием 25-ГХ. В микромолярной концентрации 25-ГХ способен снижать токи через потенциал- и кальций-активируемые калиевые каналы большой проводимости (slo1 БК). Однако этот эффект не специфичен только для 25-ГХ, поскольку другие оксистерины с гидроксильрованием в боковой цепи имеют тот же эффект [80]. Следовательно, оксистерины могут потенциально усиливать кальций-зависимые процессы за счет ограничения активности БК-каналов. Также 25-ГХ может повышать возбудимость нейронов за счет ослабления тормозного влияния со стороны ГАМК-В рецепторов. Однако этот эффект проявляется при длительном (часы) действии 25-ГХ на срезы мозга и характерен не для всех нейронов [81].

Печеночные X-рецепторы. LX-рецепторы, одним из сильных естественных активаторов которых является 25-ГХ [3], могут локализоваться на плазматических мембранах (в липидных рафтах) некоторых клеток [82, 83]. Недавно эти рецепторы были обнаружены в нервных окончаниях аксонов мотонейронов, где их распределение зависело от целостности липидных рафтов [10]. Активация синаптических LX-рецепторов 25-ГХ усиливала вовлечение синаптических везикул в экзоцитоз, что определялось выбросом кальция из ЭПС. Оказалось, что мембранные LX-рецепторы были способны путем, зависимым от Gi-белка, стимулировать фосфолипазу C и, как следствие, зави-

симое от инозитолтрифосфатных-рецепторов ЭПС повышение цитозольного Ca^{2+} . Последующая активация Ca^{2+} - и липид-зависимой протеинкиназы C усиливала мобилизацию синаптических везикул. В этих условиях в ответ на действие 25-ГХ наблюдалось также Ca^{2+} -зависимое увеличение внутри- и внеклеточного уровня активных форм кислорода. Однако последние не оказывали липид-повреждающего действия, а вносили вклад в усиление нейротрансмиссии [10]. Интересно отметить, что 24(S)-ГХ, несмотря на структурную схожесть с 25-ГХ, при кратковременном воздействии модулировал нервно-мышечную передачу путем, сопряженным с NMDA-рецепторами, но не зависимым от LX-рецепторов [73, 84].

Следует отметить, что отсутствие LX-рецепторов β ведет к заболеванию, напоминающему боковой амиотрофический склероз (БАС) с потерей мотонейронов и денервацией скелетных мышц [85]. Нокаут генов LX-рецепторов α и β вызывает дефекты локомоции, сопровождаемые окислительным стрессом и карбонилированием белков в двигательных нервах [86]. При этом также нарушается функционирование Шванновских клеток и истончается миелин в периферических нервах [72]. Наоборот, стимуляция LX-рецепторов 25-ГХ может усилить экспрессию генов миелина (*PLP*, *MBP*) в олигодендроцитах [54]. Интересно, что уровень 25-ГХ повышался в плазме у пациентов с БАС (в течение 1-го года манифестации заболевания); на досимптоматической стадии у модельных SOD1G93A мышей наблюдалось повышение экспрессии CH25H в мозге, позднее происходило повышение 25-ГХ в спинном мозге [5, 30]. Однако на поздних стадиях экспрессия CH25H уменьшалась в мозге у SOD1G93A мышей вместе со снижением концентрации метаболита 25-ГХ (7 α , 25-диГХ) в спинномозговой жидкости пациентов с БАС [5, 87].

В целом, значение повышенной продукции 25-ГХ при БАС непонятно. С одной стороны, это может быть отражением воспалительной реакции и усугублять патологию, а с другой — повышение 25-ГХ может быть компенсаторным ответом, направленным на замедление гибели мотонейронов и денервационных изменений в скелетных мышцах. Высокие концентрации 25-ГХ (≥ 5 –30 мкМ) снижают выживаемость культивируемых мотонейронов и вызывают апоптоз [5, 30], однако более низкие субмикромольные (≤ 1 мкМ) концен-

трации, которые встречаются в условиях воспалительной реакции *in vivo*, имеют обратный эффект [30]. Острое воздействие 1 мкМ 25-ГХ способно частично восстановить нарушенные свойства мембран нервно-мышечных соединений (дезорганизацию липидных рафтов, увеличение текучести мембран) у модельных SOD1G93A мышей. При этом хроническое введение низкой дозы 25-ГХ (0,4 мг/кг раз в 4 дня в течение месяца) мышам с БАС предотвращало фрагментацию нервно-мышечных синапсов, перекисное окисление липидов их мембран, накопление церамида и увеличение некантовой секреции ацетилхолина в главной дыхательной мышце — диафрагме [88]. Это указывает на терапевтическое действие 25-ГХ, поскольку фрагментация нервно-мышечных синапсов, избыточное выделение ацетилхолина, а также накопление церамида происходят при старении и миастениях, а также могут ускорять денервационные и, следовательно, атрофические изменения скелетных мышц [89–93]. Интересно, что гиперхолестеринемия является протективным фактором при БАС, а прием статинов, подавляющих синтез холестерина, наоборот, усиливает эту патологию [94, 95]. Это коррелирует с уровнем 25-ГХ в плазме: при гиперхолестеринемии он повышен, а при применении статинов — снижен [34, 96]. Возможно, 25-ГХ частично опосредует влияние гиперхолестеринемии и статинов на развитие БАС, а важной точкой приложения 25-ГХ является нервно-мышечное соединение. Действительно, меченый аналог 25-ГХ имеет высокую тропность к мембранам нервно-мышечных соединений, особенно у модельных животных с БАС [88]. Главные продуценты 25-ГХ, макрофаги, напрямую контактируют с нервно-мышечным синапсом при повреждении нерва и патологиях, сопровождающихся денервациями — и эти взаимодействия облегчают реиннервацию [59, 70]. Макрофаги также способствуют симпатической (адренергической) иннервации периферических тканей [97], а β -адренергическая передача может модулироваться ГХ [12].

Недавно было показано, что 25-ГХ обладает сенолитическими свойствами в скелетной мышце, препятствуя появлению признаков старения (агрегации CRYAB) и воспаления [98]. Повышенная продукция 25-ГХ (через активацию LX-рецепторов) может улучшать состояние в модели неалкогольной жировой болезни печени [99], которая сопровождается

нарушениями нервно-мышечной системы и нейродегенеративными изменениями. В дополнение, ГХ активируют ядерные LX-рецепторы в постсинаптических областях мышечных волокон, что ведет к усилению экспрессии NO-синтаз (эндотелиальной и нейрональной изоформ) и синтеза NO в ходе нервно-мышечной передачи [100]. В свою очередь, NO препятствует мышечной атрофии в ответ на мышечную разгрузку [101, 102], которая сопровождается ранними синаптическими изменениями, включающими нарушения липидных рафтов, увеличение текучести мембран и накопление церамида в синаптических мембранах [91, 92, 103]. Подобные события возникают и на ранних стадиях БАС и могут быть скорректированы за счет введения 25-ГХ [88].

Эстрогеновые рецепторы (ЭР). Мембранные LX-рецепторы могут напрямую взаимодействовать с ЭР α [82]. Более того, ЭР α являются потенциальными мишенями для 25-ГХ и, стимулируя их, 25-ГХ проявляет эстроген-подобную активность в ряде клеток [9]. Усиление мобилизации синаптических везикул в нервных окончаниях аксонов мотонейронов под влиянием 25-ГХ также зависит от ЭР α [10]. Интересно, что в центральных синапсах активация ЭР α (17 β -эстрадиолом) способна быстро вызывать долговременную синаптическую пластичность, вследствие встраивания глутаматных AMPA-рецепторов в постсинаптическую мембрану [104]. С другой стороны, вызванное гиперхолестеринемией повышение 27-ГХ, способного блокировать ЭР, снижает экспрессию постсинаптического маркера PSD-95 в гиппокампе [105].

Орфанный рецептор, связанный с ретиноидным X-рецептором (ROR). Кроме LX-рецепторов, 25-ГХ, наряду с другими стеринами, может связываться с ядерными рецепторами ROR (retinoid receptor-related orphan receptor), выступая в качестве агониста, нейтрального лиганда или обратного агониста в зависимости от типа ROR-рецептора [106, 107]. Активация ROR важна для организации коры, развития нейронов, регуляции циркадных ритмов, а также может подавлять нейровоспаление за счет угнетения активности транскрипционного фактора NF κ B и продукции провоспалительных цитокинов глияльными клетками [108, 109].

Прямое действие 25-ГХ на мембранные свойства. Оксистерины при взаимодействии с плазматическими мембранами могут влиять на

их биофизические свойства и формирование липидных микродоменов [88, 110–112]. Причем структурно схожие оксистерины способны оказывать разнонаправленный эффект на плазматические, в том числе синаптические, мембраны [110]. Исследования свойств формирующих рафты липидов в лентивирусных монослоях показывают, что 25-ГХ с большей силой, чем холестерин, взаимодействует со сфингомиелином и с чуть меньшей — с ганглиозидом GM1. Следовательно, 25-ГХ может участвовать в формировании липидных рафтов и даже вытеснять холестерин из них [113]. Действительно, добавление 25-ГХ к искусственной бислойной мембране (из смеси холестерина и 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилхолина) ведет к смещению холестерина в сторону водной поверхности и увеличению его доступности для внешних акцепторов, что снижает способность холестерина конденсировать бислой [114]. При этом способность 25-ГХ увеличивать доступность мембранного холестерина зависит от липидного состава и сильнее проявляется в мембранах, содержащих больше ненасыщенных липидов [115]. Сам 25-ГХ способствует формированию микродоменов, обогащенных насыщенными липидами, в искусственных мембранах [116], а также увеличению упорядоченности и снижению текучести мембран нервно-мышечных синапсов [88]. С другой стороны, 25-ГХ, принимая «наклоненную» (по отношению к хвостам фосфолипидов) ориентацию, способен расширять латерально и делать тоньше искусственные бислойные мембраны [117], особенно состоящие из ненасыщенных липидов [118]. Также 25-ГХ может подавлять слияние липидных рафтов в более крупные микродомены в микроглии [14]. Антивирусные свойства 25-ГХ частично связаны с его прямым действием на свойства плазматических мембран, в результате чего подавляется слияние вирусов, в том числе нейротропных, с клетками [119]. Учитывая важность мембранных свойств для протекания множества процессов в нервной системе [14, 56, 120], прямые эффекты 25-ГХ на стабильность липидных рафтов, текучесть и толщину мембран, а также доступность холестерина могут вносить вклад в перестройку нейрональной активности в условиях воспаления. Следует отметить, что эти эффекты 25-ГХ зависят от липидного состава мембран и поэтому могут отличаться в нейронах и глии, а также различных компартментах клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, 25-ГХ, с одной стороны, является важным регулятором гомеостаза холестерина в отдельной взятой клетке, а с другой — может опосредовать влияния воспаления, действуя как паракринный агент или даже системно. Высокая проникающая способность 25-ГХ, а также существование высокоаффинных к 25-ГХ рецепторов, экспрессирующихся в нейронах и глиальных клетках, делают этот окистерин важным модулятором деятельности нервной системы, а фермент СН25Н — потенциальной мишенью для фармакологических интервенций. Продукция 25-ГХ в ответ на повреждения может выполнять нейропротективную роль, способствуя оптимизации синаптической передачи и миелинизации, а также ограничивая нейровоспаление и гибель нейронов. При этом сверхвысокие концентрации 25-ГХ, часто используемые в клеточных исследованиях, могут иметь негативные последствия для функционирования нервной системы. Следовательно, дополнительные ис-

следования должны дать ответ о направленности действия 25-ГХ *in vivo* в норме и патологии, в частности, при нейродегенеративных заболеваниях.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-04-00077 (части 3.1–3.7), а также частично грантов РНФ № 22-25-00396 (части 1 и 2) и № 21-14-00044 (часть 3.8).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Закирьяновой Г.Ф. и проф. Бухараевой Э.А. за обсуждение данного обзора. Работа частично поддержана государственным заданием для ФИЦ Казанского научного центра РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Petrov, A. M., Kasimov, M. R., and Zefirov, A. L. (2016) Brain cholesterol metabolism and its defects: Linkage to neurodegenerative diseases and synaptic dysfunction, *Acta Naturae*, **8**, 58-73, doi 10.32607/20758251-2016-8-1-58-73.
2. Lund, E. G., Kerr, T. A., Sakai, J., Li, W. P., and Russell, D. W. (1998) cDNA cloning of mouse and human cholesterol 25-hydroxylases, polytopic membrane proteins that synthesize a potent oxysterol regulator of lipid metabolism, *J. Biol. Chem.*, **273**, 34316-34327, doi: 10.1074/jbc.273.51.34316.
3. Cyster, J. G., Dang, E. V., Reboldi, A., and Yi, T. (2014) 25-Hydroxycholesterols in innate and adaptive immunity, *Nat. Rev. Immunol.*, **14**, 731-743, doi: 10.1038/nri3755.
4. Wong, M. Y., Lewis, M., Doherty, J. J., Shi, Y., Cashikar, A. G., et al. (2020) 25-Hydroxycholesterol amplifies microglial IL-1 β production in an apoE isoform-dependent manner, *J. Neuroinflamm.*, **17**, 192, doi: 10.1186/s12974-020-01869-3.
5. Kim, S. M., Noh, M. Y., Kim, H., Cheon, S. Y., Lee, K. M., et al. (2017) 25-Hydroxycholesterol is involved in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis, *Oncotarget*, **8**, 11855-11867, doi: 10.18632/oncotarget.14416.
6. Madenspacher, J. H., Morrell, E. D., Gowdy, K. M., McDonald, J. G., Thompson, B. M., et al. (2020) Cholesterol 25-hydroxylase promotes efferocytosis and resolution of lung inflammation, *JCI Insight*, **5**, doi: 10.1172/jci.insight.137189.
7. Linsenbardt, A. J., Taylor, A., Emnett, C. M., Doherty, J. J., Krishnan, K., et al. (2014) Different oxysterols have opposing actions at N-methyl-D-aspartate receptors, *Neuropharmacology*, **85**, 232-242, doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.05.027.
8. Pokharel, S. M., Shil, N. K., Gc, J. B., Colburn, Z. T., Tsai, S. Y., et al. (2019) Integrin activation by the lipid molecule 25-hydroxycholesterol induces a proinflammatory response, *Nat. Commun.*, **10**, 1482, doi: 10.1038/s41467-019-09453-x.
9. Lappano, R., Recchia, A. G., De Francesco, E. M., Angelone, T., Cerra, M. C., et al. (2011) The cholesterol metabolite 25-hydroxycholesterol activates estrogen receptor α -mediated signaling in cancer cells and in cardiomyocytes, *PLoS One*, **6**, e16631, doi: 10.1371/journal.pone.0016631.
10. Zakyrjanova, G. F., Tsentsevitsky, A. N., Kuznetsova, E. A., and Petrov, A. M. (2021) Immune-related oxysterol modulates neuromuscular transmission via non-genomic liver X receptor-dependent mechanism, *Free Radic Biol. Med.*, **174**, 121-134, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.013.
11. Leoni, V., Masterman, T., Patel, P., Meaney, S., Diczfalussy, U., et al. (2003) Side chain oxidized

- oxysterols in cerebrospinal fluid and the integrity of blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers, *J. Lipid Res.*, **44**, 793-799, doi: 10.1194/jlr.M200434-JLR200.
12. Odnoshivkina, U. G., Sytchev, V. I., Starostin, O., and Petrov, A. M. (2019) Brain cholesterol metabolite 24-hydroxycholesterol modulates inotropic responses to beta-adrenoceptor stimulation: The role of NO and phosphodiesterase, *Life Sci.*, **220**, 117-126, doi: 10.1016/j.lfs.2019.01.054.
 13. Liu, S. Y., Aliyari, R., Chikere, K., Li, G., Marsden, M. D., et al. (2013) Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase broadly inhibits viral entry by production of 25-hydroxycholesterol, *Immunity*, **38**, 92-105, doi: 10.1016/j.immuni.2012.11.005.
 14. Lee, J. H., Han, J. H., Woo, J. H., and Jou, I. (2022) 25-Hydroxycholesterol suppress IFN-gamma-induced inflammation in microglia by disrupting lipid raft formation and caveolin-mediated signaling endosomes, *Free Radic Biol. Med.*, **179**, 252-265, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.11.017.
 15. Nugent, A. A., Lin, K., van Lengerich, B., Lianoglou, S., Przybyla, L., et al. (2020) TREM2 regulates microglial cholesterol metabolism upon chronic phagocytic challenge, *Neuron*, **105**, 837-854 e839, doi: 10.1016/j.neuron.2019.12.007.
 16. Li, Z., Martin, M., Zhang, J., Huang, H. Y., Bai, L., et al. (2017) Kruppel-like factor 4 regulation of cholesterol-25-hydroxylase and liver X receptor mitigates atherosclerosis susceptibility, *Circulation*, **136**, 1315-1330, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027462.
 17. Gold, E. S., Ramsey, S. A., Sartain, M. J., Selinummi, J., Podolsky, I., et al. (2012) ATF3 protects against atherosclerosis by suppressing 25-hydroxycholesterol-induced lipid body formation, *J. Exp. Med.*, **209**, 807-817, doi: 10.1084/jem.20111202.
 18. Liu, Y., Wei, Z., Ma, X., Yang, X., Chen, Y., et al. (2018) 25-Hydroxycholesterol activates the expression of cholesterol 25-hydroxylase in an LXR-dependent mechanism, *J. Lipid Res.*, **59**, 439-451, doi: 10.1194/jlr.M080440.
 19. Wang, J. H., and Tuohimaa, P. (2006) Regulation of cholesterol 25-hydroxylase expression by vitamin D3 metabolites in human prostate stromal cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **345**, 720-725, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.04.156.
 20. Ke, W., Fang, L., Tao, R., Li, Y., Jing, H., et al. (2019) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus E protein degrades porcine cholesterol 25-hydroxylase via the ubiquitin-proteasome pathway, *J. Virol.*, **93**, doi: 10.1128/JVI.00767-19.
 21. Diczfalusy, U., Olofsson, K. E., Carlsson, A. M., Gong, M., Golenbock, D. T., et al. (2009) Marked upregulation of cholesterol 25-hydroxylase expression by lipopolysaccharide, *J. Lipid Res.*, **50**, 2258-2264, doi: 10.1194/jlr.M900107-JLR200.
 22. Bauman, D. R., Bitmansour, A. D., McDonald, J. G., Thompson, B. M., Liang, G., et al. (2009) 25-Hydroxycholesterol secreted by macrophages in response to Toll-like receptor activation suppresses immunoglobulin A production, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 16764-16769, doi: 10.1073/pnas.0909142106.
 23. Kaushik, D. K., Gupta, M., Das, S., and Basu, A. (2010) Kruppel-like factor 4, a novel transcription factor regulates microglial activation and subsequent neuroinflammation, *J. Neuroinflamm.*, **7**, 68, doi: 10.1186/1742-2094-7-68.
 24. Liao, X., Sharma, N., Kapadia, F., Zhou, G., Lu, Y., et al. (2011) Kruppel-like factor 4 regulates macrophage polarization, *J. Clin. Invest.*, **121**, 2736-2749, doi: 10.1172/JCI45444.
 25. Wen, M., Ye, J., Han, Y., Huang, L., Yang, H., et al. (2018) Hypertonic saline regulates microglial M2 polarization via miR-200b/KLF4 in cerebral edema treatment, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **499**, 345-353, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.161.
 26. Kimura, T., Nada, S., Takegahara, N., Okuno, T., Nojima, S., et al. (2016) Polarization of M2 macrophages requires Lamtor1 that integrates cytokine and amino-acid signals, *Nat. Commun.*, **7**, 13130, doi: 10.1038/ncomms13130.
 27. Ofengeim, D., Mazzitelli, S., Ito, Y., DeWitt, J. P., Mifflin, L., et al. (2017) RIPK1 mediates a disease-associated microglial response in Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E8788-E8797, doi: 10.1073/pnas.1714175114.
 28. Jang, J., Park, S., Jin Hur, H., Cho, H. J., Hwang, I., et al. (2016) 25-hydroxycholesterol contributes to cerebral inflammation of X-linked adrenoleukodystrophy through activation of the NLRP3 inflammasome, *Nat. Commun.*, **7**, 13129, doi: 10.1038/ncomms13129.
 29. Chitu, V., Biundo, F., Shlager, G. G. L., Park, E. S., Wang, P., et al. (2020) Microglial homeostasis requires balanced CSF-1/CSF-2 receptor signaling, *Cell Rep.*, **30**, 3004-3019.e3005, doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.028.
 30. Dodge, J. C., Yu, J., Sardi, S. P., and Shihabuddin, L. S. (2021) Sterol auto-oxidation adversely affects human motor neuron viability and is a neuropathological feature of amyotrophic lateral sclerosis, *Sci. Rep.*, **11**, 803, doi: 10.1038/s41598-020-80378-y.
 31. Marelli, C., Lamari, F., Rainteau, D., Lafourcade, A., Banneau, G., et al. (2018) Plasma oxysterols: Biomarkers for diagnosis and treatment in spastic paraplegia type 5, *Brain*, **141**, 72-84, doi: 10.1093/brain/awx297.
 32. Tanaka, T., Murakami, K., Bando, Y., Nomura, T., Isonishi, A., et al. (2017) Microglia support ATF3-positive neurons following hypoglossal nerve axotomy, *Neurochem. Int.*, **108**, 332-342, doi: 10.1016/j.neuint.2017.05.007.
 33. Kim, H., Lee, H. S., Ahn, J. H., Hong, K. S., Jang, J. G., et al. (2021) Lung-selective 25-hydroxycholesterol nanotherapeutics as a suppressor of

- COVID-19-associated cytokine storm, *Nano Today*, **38**, 101149, doi: 10.1016/j.nantod.2021.101149.
34. Johnson, K. A., Morrow, C. J., Knight, G. D., and Scallen, T. J. (1994) *In vivo* formation of 25-hydroxycholesterol from endogenous cholesterol after a single meal, dietary cholesterol challenge, *J. Lipid Res.*, **35**, 2241-2253.
 35. Russo, L., Muir, L., Geletka, L., Delproposto, J., Baker, N., et al. (2020) Cholesterol 25-hydroxylase (CH25H) as a promoter of adipose tissue inflammation in obesity and diabetes, *Mol. Metab.*, **100983**, doi: 10.1016/j.molmet.2020.100983.
 36. Xu, H., Sun, B., Jia, L., Wei, Y., Liao, Z., and Liang, M. (2020) Cloning and characterization of cholesterol 25-hydroxylase (ch25h) from a Marine Teleost, Chinese Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*), and its gene expressions in response to dietary arachidonic acid, *Front. Marine Sci.*, **6**, doi: 10.3389/fmars.2019.00800.
 37. Ponda, M. P., Liang, Y., Kim, J., Hutt, R., Dowd, K., et al. (2017) A randomized clinical trial in vitamin D-deficient adults comparing replenishment with oral vitamin D3 with narrow-band UV type B light: Effects on cholesterol and the transcriptional profiles of skin and blood, *Am. J. Clin. Nutr.*, **105**, 1230-1238, doi: 10.3945/ajcn.116.150367.
 38. De Oliveira, L. R. C., Mimura, L. A. N., Fraga-Silva, T. F. C., Ishikawa, L. L. W., Fernandes, A. A. H., et al. (2020) Calcitriol prevents neuroinflammation and reduces blood-brain barrier disruption and local macrophage/microglia activation, *Front. Pharmacol.*, **11**, 161, doi: 10.3389/fphar.2020.00161.
 39. Cui, C., Xu, P., Li, G., Qiao, Y., Han, W., et al. (2019) Vitamin D receptor activation regulates microglia polarization and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats and angiotensin II-exposed microglial cells: Role of renin-angiotensin system, *Redox Biol.*, **26**, 101295, doi: 10.1016/j.redox.2019.101295.
 40. Honda, A., Miyazaki, T., Ikegami, T., Iwamoto, J., Maeda, T., et al. (2011) Cholesterol 25-hydroxylation activity of CYP3A, *J. Lipid Res.*, **52**, 1509-1516, doi: 10.1194/jlr.M014084.
 41. Meng, Y., Heybrock, S., Neculai, D., and Saftig, P. (2020) Cholesterol handling in lysosomes and beyond, *Trends Cell Biol.*, **30**, 452-466, doi: 10.1016/j.tcb.2020.02.007.
 42. Luo, J., Yang, H., and Song, B. L. (2020) Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 225-245, doi: 10.1038/s41580-019-0190-7.
 43. Ridsdale, A., Denis, M., Gougeon, P. Y., Ngsee, J. K., Presley, J. F., et al. (2006) Cholesterol is required for efficient endoplasmic reticulum-to-Golgi transport of secretory membrane proteins, *Mol. Biol. Cell*, **17**, 1593-1605, doi: 10.1091/mbc.e05-02-0100.
 44. Sever, N., Yang, T., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and DeBose-Boyd, R. A. (2003) Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain, *Mol. Cell*, **11**, 25-33, doi: 10.1016/s1097-2765(02)00822-5.
 45. Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (2009) Cholesterol feedback: From Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL, *J. Lipid Res.*, **50 Suppl**, S15-27, doi: 10.1194/jlr.R800054-JLR200.
 46. Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Kwon, H. J., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (2007) Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Oxysterols block transport by binding to Insig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 6511-6518, doi: 10.1073/pnas.0700899104.
 47. Walzl, S., Patankar, J. V., Fauler, G., Nussold, C., Ullen, A., et al. (2013) 25-Hydroxycholesterol regulates cholesterol homeostasis in the murine CATH. a neuronal cell line, *Neurosci. Lett.*, **539**, 16-21, doi: 10.1016/j.neulet.2013.01.014.
 48. Reboldi, A., Dang, E. V., McDonald, J. G., Liang, G., Russell, D. W., et al. (2014) Inflammation. 25-Hydroxycholesterol suppresses interleukin-1-driven inflammation downstream of type I interferon, *Science*, **345**, 679-684, doi: 10.1126/science.1254790.
 49. Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R., and Tontonoz, P. (2009) LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor, *Science*, **325**, 100-104, doi: 10.1126/science.1168974.
 50. Baldan, A., Bojanic, D. D., and Edwards, P. A. (2009) The ABCs of sterol transport, *J. Lipid Res.*, **50 Suppl**, S80-85, doi: 10.1194/jlr.R800044-JLR200.
 51. Suchanek, M., Hynynen, R., Wohlfahrt, G., Lehto, M., Johansson, M., et al. (2007) The mammalian oxysterol-binding protein-related proteins (ORPs) bind 25-hydroxycholesterol in an evolutionarily conserved pocket, *Biochem. J.*, **405**, 473-480, doi: 10.1042/BJ20070176.
 52. Alpy, F., and Tomasetto, C. (2005) Give lipids a START: The StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals, *J. Cell Sci.*, **118**, 2791-2801, doi: 10.1242/jcs.02485.
 53. Abrams, M. E., Johnson, K. A., Perelman, S. S., Zhang, L. S., Endapally, S., et al. (2020) Oxysterols provide innate immunity to bacterial infection by mobilizing cell surface accessible cholesterol, *Nat. Microbiol.*, **5**, 929-942, doi: 10.1038/s41564-020-0701-5.
 54. Meffre, D., Shackleford, G., Hichor, M., Gorgievski, V., Tzavara, E. T., et al. (2015) Liver X receptors alpha and beta promote myelination and remyelination in the cerebellum, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 7587-7592, doi: 10.1073/pnas.1424951112.
 55. Lee, S. D., Priest, C., Bjursell, M., Gao, J., Arneson, D. V., et al. (2019) IDOL regulates systemic energy balance through control of neuronal VLDLR expression, *Nat. Metab.*, **1**, 1089-1100, doi: 10.1038/s42255-019-0127-7.
 56. Krivoi, I. I., and Petrov, A. M. (2019) Cholesterol and the safety factor for neuromuscular transmission, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, doi: 10.3390/ijms20051046.

57. Petrov, A. M., and Pikuleva, I. A. (2019) Cholesterol 24-Hydroxylation by CYP46A1: Benefits of modulation for brain diseases, *Neurotherapeutics*, **16**, 635-648, doi: 10.1007/s13311-019-00731-6.
58. Izumi, Y., Cashikar, A. G., Krishnan, K., Paul, S. M., Covey, D. F., et al. (2021) A proinflammatory stimulus disrupts hippocampal plasticity and learning via microglial activation and 25-hydroxycholesterol, *J. Neurosci.*, **41**, 10054-10064, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1502-21.2021.
59. Rios, R., Jablonka-Shariff, A., Broberg, C., and Snyder-Warwick, A. K. (2021) Macrophage roles in peripheral nervous system injury and pathology: Allies in neuromuscular junction recovery, *Mol. Cell. Neurosci.*, **111**, 103590, doi: 10.1016/j.mcn.2021.103590.
60. Cao, J., Gan, H., Xiao, H., Chen, H., Jian, D., et al. (2021) Key protein-coding genes related to microglia in immune regulation and inflammatory response induced by epilepsy, *Math. Biosci. Eng.*, **18**, 9563-9578, doi: 10.3934/mbe.2021469.
61. Klejbor, I., Shimshek, D. R., Klimasewska-Lata, J., Velasco-Estevez, M., Morys, J., et al. (2021) EBI2 is expressed in glial cells in multiple sclerosis lesions, and its knock-out modulates remyelination in the cuprizone model, *Eur. J. Neurosci.*, **54**, 5173-5188, doi: 10.1111/ejn.15359.
62. Rutkowska, A., Shimshek, D. R., Sailer, A. W., and Dev, K. K. (2018) EBI2 regulates pro-inflammatory signalling and cytokine release in astrocytes, *Neuropharmacology*, **133**, 121-128, doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.01.029.
63. Zhang, Z. J., Jiang, B. C., and Gao, Y. J. (2017) Chemokines in neuron-glial cell interaction and pathogenesis of neuropathic pain, *Cell. Mol. Life Sci.*, **74**, 3275-3291, doi: 10.1007/s00018-017-2513-1.
64. Skinner, D. D., and Lane, T. E. (2020) CXCR2 signaling and remyelination in preclinical models of demyelination, *DNA Cell Biol.*, **39**, 3-7, doi: 10.1089/dna.2019.5182.
65. Raccosta, L., Fontana, R., Maggioni, D., Lanterna, C., Villablanca, E. J., et al. (2013) The oxysterol-CXCR2 axis plays a key role in the recruitment of tumor-promoting neutrophils, *J. Exp. Med.*, **210**, 1711-1728, doi: 10.1084/jem.20130440.
66. Shida, M., Mikami, T., Tamura, J. I., and Kitagawa, H. (2019) Chondroitin sulfate-D promotes neurite outgrowth by acting as an extracellular ligand for neuronal integrin alphaVbeta3, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1863**, 1319-1331, doi: 10.1016/j.bbagen.2019.06.004.
67. Gardiner, N. J., Moffatt, S., Fernyhough, P., Humphries, M. J., Streuli, C. H., et al. (2007) Preconditioning injury-induced neurite outgrowth of adult rat sensory neurons on fibronectin is mediated by mobilisation of axonal alpha5 integrin, *Mol. Cell Neurosci.*, **35**, 249-260, doi: 10.1016/j.mcn.2007.02.020.
68. Wakatsuki, S., Araki, T., and Sehara-Fujisawa, A. (2014) Neuregulin-1/glial growth factor stimulates Schwann cell migration by inducing alpha5 beta1 integrin-ErbB2-focal adhesion kinase complex formation, *Genes Cells*, **19**, 66-77, doi: 10.1111/gtc.12108.
69. Cheng, Z., Zhang, Y., Tian, Y., Chen, Y., Ding, F., et al. (2021) Cyr61 promotes Schwann cell proliferation and migration via alphaVbeta3 integrin, *BMC Mol. Cell Biol.*, **22**, 21, doi: 10.1186/s12860-021-00360-y.
70. Lu, C. Y., Santosa, K. B., Jablonka-Shariff, A., Vannucci, B., Fuchs, A., et al. (2020) Macrophage-derived vascular endothelial growth factor-A is integral to neuromuscular junction reinnervation after nerve injury, *J. Neurosci.*, **40**, 9602-9616, doi: 10.1523/jneurosci.1736-20.2020.
71. Fu, Q., Goodrum, J. F., Hayes, C., Hostettler, J. D., Toews, A. D., et al. (1998) Control of cholesterol biosynthesis in Schwann cells, *J. Neurochem.*, **71**, 549-555, doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.71020549.x.
72. Makoukji, J., Shackelford, G., Meffre, D., Grenier, J., Liere, P., et al. (2011) Interplay between LXR and Wnt/beta-catenin signaling in the negative regulation of peripheral myelin genes by oxysterols, *J. Neurosci.*, **31**, 9620-9629, doi: 10.1523/jneurosci.0761-11.2011.
73. Kasimov, M. R., Fatkhrahmanova, M. R., Mukhutdinova, K. A., and Petrov, A. M. (2017) 24S-Hydroxycholesterol enhances synaptic vesicle cycling in the mouse neuromuscular junction: Implication of glutamate NMDA receptors and nitric oxide, *Neuropharmacology*, **117**, 61-73, doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.01.030.
74. Wei, X., Nishi, T., Kondou, S., Kimura, H., and Mody, I. (2019) Preferential enhancement of GluN2B-containing native NMDA receptors by the endogenous modulator 24S-hydroxycholesterol in hippocampal neurons, *Neuropharmacology*, **148**, 11-20, doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.12.028.
75. Sun, M. Y., Taylor, A., Zorumski, C. F., and Mennerick, S. (2017) 24S-hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol differentially impact hippocampal neuronal survival following oxygen-glucose deprivation, *PLoS One*, **12**, e0174416, doi: 10.1371/journal.pone.0174416.
76. Lin, F., Yao, X., Kong, C., Liu, X., Zhao, Z., et al. (2021) 25-Hydroxycholesterol protecting from cerebral ischemia-reperfusion injury through the inhibition of STING activity, *Aging (Albany NY)*, **13**, 20149-20163, doi: 10.18632/aging.203337.
77. Ullrich, C., Pirchl, M., and Humpel, C. (2010) Effects of cholesterol and its 24S-OH and 25-OH oxysterols on choline acetyltransferase-positive neurons in brain slices, *Pharmacology*, **86**, 15-21, doi: 10.1159/000314333.
78. Chang, J. Y., and Liu, L. Z. (1997) 25-Hydroxycholesterol causes death but does not prevent nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells, *Neurochem. Int.*, **31**, 517-523, doi: 10.1016/s0197-0186(97)00020-x.

79. Olivier, E., Dutot, M., Regazzetti, A., Leguillier, T., Dargere, D., et al. (2016) P2X7-pannexin-1 and amyloid beta-induced oxysterol input in human retinal cell: Role in age-related macular degeneration? *Biochimie*, **127**, 70-78, doi: 10.1016/j.biochi.2016.04.014.
80. Tajima, N., Xiaoyan, L., Taniguchi, M., and Kato, N. (2019) 24S-hydroxycholesterol alters activity of large-conductance Ca^{2+} -dependent K^+ (slo1 BK) channel through intercalation into plasma membrane, *Biochim Biophys Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, **1864**, 1525-1535, doi: 10.1016/j.bbalip.2019.05.010.
81. Phelan, K. D., and Mahler, H. R. (1997) Acute exposure to 25-hydroxy-cholesterol selectively reduces GABA_B and not GABA_A receptor-mediated synaptic inhibition, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **237**, 68-73, doi: 10.1006/bbrc.1997.7070.
82. Ishikawa, T., Yuhanna, I. S., Umetani, J., Lee, W. R., Korach, K. S., et al. (2013) LXRbeta/estrogen receptor-alpha signaling in lipid rafts preserves endothelial integrity, *J. Clin. Invest.*, **123**, 3488-3497, doi: 10.1172/JCI66533.
83. Unsworth, A. J., Flora, G. D., and Gibbins, J. M. (2018) Non-genomic effects of nuclear receptors: Insights from the anucleate platelet, *Cardiovasc. Res.*, **114**, 645-655, doi: 10.1093/cvr/cvy044.
84. Mukhutdinova, K. A., Kasimov, M. R., Giniatullin, A. R., Zakyranova, G. F., and Petrov, A. M. (2018) 24S-hydroxycholesterol suppresses neuromuscular transmission in SOD1(G93A) mice: A possible role of NO and lipid rafts, *Mol. Cell Neurosci.*, **88**, 308-318, doi: 10.1016/j.mcn.2018.03.006.
85. Bigini, P., Steffensen, K. R., Ferrario, A., Diomede, L., Ferrara, G., et al. (2010) Neuropathologic and biochemical changes during disease progression in liver X receptor beta^{-/-} mice, a model of adult neuron disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **69**, 593-605, doi: 10.1097/NEN.0b013e3181df20e1.
86. Hichor, M., Sundaram, V. K., Eid, S. A., Abdel-Rassoul, R., Petit, P. X., et al. (2018) Liver X Receptor exerts a protective effect against the oxidative stress in the peripheral nerve, *Sci. Rep.*, **8**, 2524, doi: 10.1038/s41598-018-20980-3.
87. Abdel-Khalik, J., Yutuc, E., Crick, P. J., Gustafsson, J. A., Warner, M., et al. (2017) Defective cholesterol metabolism in amyotrophic lateral sclerosis, *J. Lipid Res.*, **58**, 267-278, doi: 10.1194/jlr.P071639.
88. Zakyranova, G. F., Giniatullin, A. R., Mukhutdinova, K. A., Kuznetsova, E. A., and Petrov, A. M. (2021) Early differences in membrane properties at the neuromuscular junctions of ALS model mice: Effects of 25-hydroxycholesterol, *Life Sci.*, **273**, 119300, doi: 10.1016/j.lfs.2021.119300.
89. Henriques, A., Croixmarie, V., Priestman, D. A., Rosenbohm, A., Dirrig-Grosch, S., et al. (2015) Amyotrophic lateral sclerosis and denervation alter sphingolipids and up-regulate glucosylceramide synthase, *Hum. Mol. Genet.*, **24**, 7390-7405, doi: 10.1093/hmg/ddv439.
90. Sugita, S., Fleming, L. L., Wood, C., Vaughan, S. K., Gomes, M. P., et al. (2016) VACHT overexpression increases acetylcholine at the synaptic cleft and accelerates aging of neuromuscular junctions, *Skelet. Muscle*, **6**, 31, doi: 10.1186/s13395-016-0105-7.
91. Bryndina, I. G., Shalagina, M. N., Sekunov, A. V., Zefirov, A. L., and Petrov, A. M. (2018) Clomipramine counteracts lipid raft disturbance due to short-term muscle disuse, *Neurosci. Lett.*, **664**, 1-6, doi: 10.1016/j.neulet.2017.11.009.
92. Petrov, A. M., Shalagina, M. N., Protopopov, V. A., Sergeev, V. G., Ovechkin, S. V., et al. (2019) Changes in membrane ceramide pools in rat soleus muscle in response to short-term disuse, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, doi: 10.3390/ijms20194860.
93. Slater, C. R. (2020) "Fragmentation" of NMJs: a sign of degeneration or regeneration? A long journey with many junctions, *Neuroscience*, **439**, 28-40, doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.05.017.
94. Dupuis, L., Corcia, P., Fergani, A., Gonzalez De Aguilar, J. L., Bonnefont-Rousselot, D., et al. (2008) Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis, *Neurology*, **70**, 1004-1009, doi: 10.1212/01.wnl.0000285080.70324.27.
95. Su, X. W., Nandar, W., Neely, E. B., Simmons, Z., and Connor, J. R. (2016) Statins accelerate disease progression and shorten survival in SOD1(G93A) mice, *Muscle Nerve*, **54**, 284-291, doi: 10.1002/mus.25048.
96. Dias, I. H. K., Milic, I., Lip, G. Y. H., Devitt, A., Polidori, M. C., et al. (2018) Simvastatin reduces circulating oxysterol levels in men with hypercholesterolaemia, *Redox Biol.*, **16**, 139-145, doi: 10.1016/j.redox.2018.02.014.
97. Wolf, Y., Boura-Halfon, S., Cortese, N., Haimon, Z., Sar Shalom, H., et al. (2017) Brown-adipose-tissue macrophages control tissue innervation and homeostatic energy expenditure, *Nat. Immunol.*, **18**, 665-674, doi: 10.1038/ni.3746.
98. Limbad, C., Doi, R., McGirr, J., Ciotlos, S., Perez, K., et al. (2022) Senolysis induced by 25-hydroxycholesterol targets CRYAB in multiple cell types, *iScience*, **25**, 103848, doi: 10.1016/j.isci.2022.103848.
99. Dong, Z., He, F., Yan, X., Xing, Y., Lei, Y., et al. (2022) Hepatic reduction in cholesterol 25-hydroxylase aggravates diet-induced steatosis, *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, **13**, 1161-1179, doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.12.018.
100. Mukhutdinova, K. A., Kasimov, M. R., Zakyranova, G. F., Gumerova, M. R., and Petrov, A. M. (2019) Oxysterol modulates neurotransmission via liver-X receptor/NO synthase-dependent pathway at the mouse neuromuscular junctions, *Neuropharmacology*, **150**, 70-79, doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.03.018.

101. Tyganov, S. A., Mochalova, E., Belova, S., Sharlo, K., Rozhkov, S., et al. (2021) Plantar mechanical stimulation attenuates protein synthesis decline in disused skeletal muscle via modulation of nitric oxide level, *Sci. Rep.*, **11**, 9806, doi: 10.1038/s41598-021-89362-6.
102. Tyganov, S. A., Mochalova, E. P., Melnikov, I. Y., Vikhlyantsev, I. M., Ulanova, A. D., et al. (2021) NOS-dependent effects of plantar mechanical stimulation on mechanical characteristics and cytoskeletal proteins in rat soleus muscle during hindlimb suspension, *FASEB. J.*, **35**, e21905, doi: 10.1096/fj.202100783R.
103. Petrov, A. M., Kravtsova, V. V., Matchkov, V. V., Vasiliev, A. N., Zefirov, A. L., et al. (2017) Membrane lipid rafts are disturbed in the response of rat skeletal muscle to short-term disuse, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **312**, C627-C637, doi: 10.1152/ajpcell.00365.2016.
104. Clements, L., and Harvey, J. (2020) Activation of oestrogen receptor alpha induces a novel form of LTP at hippocampal temporoammonic-CA1 synapses, *Br. J. Pharmacol.*, **177**, 642-655, doi: 10.1111/bph.14880.
105. Brooks, S. W., Dykes, A. C., and Schreurs, B. G. (2017) A high-cholesterol diet increases 27-hydroxycholesterol and modifies estrogen receptor expression and neurodegeneration in rabbit hippocampus, *J. Alzheimer's Dis.*, **56**, 185-196, doi: 10.3233/JAD-160725.
106. Jetten, A. M., Takeda, Y., Slominski, A., and Kang, H. S. (2018) Retinoic acid-related Orphan Receptor gamma (RORgamma): Connecting sterol metabolism to regulation of the immune system and autoimmune disease, *Curr. Opin. Toxicol.*, **8**, 66-80, doi: 10.1016/j.cotox.2018.01.005.
107. Solt, L. A., Griffin, P. R., and Burris, T. P. (2010) Ligand regulation of retinoic acid receptor-related orphan receptors: Implications for development of novel therapeutics, *Curr. Opin. Lipidol.*, **21**, 204-211, doi: 10.1097/MOL.0b013e328338ca18.
108. Journiac, N., Jolly, S., Jarvis, C., Gautheron, V., Rogard, M., et al. (2009) The nuclear receptor ROR(alpha) exerts a bi-directional regulation of IL-6 in resting and reactive astrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 21365-21370, doi: 10.1073/pnas.0911782106.
109. Schaeren-Wiemers, N., Andre, E., Kapfhammer, J. P., and Becker-Andre, M. (1997) The expression pattern of the orphan nuclear receptor RORbeta in the developing and adult rat nervous system suggests a role in the processing of sensory information and in circadian rhythm, *Eur. J. Neurosci.*, **9**, 2687-2701, doi: 10.1111/j.1460-9568.1997.tb01698.x.
110. Kasimov, M. R., Zakyrtanova, G. F., Giniatullin, A. R., Zefirov, A. L., and Petrov, A. M. (2016) Similar oxysterols may lead to opposite effects on synaptic transmission: Olesoxime versus 5alpha-cholestan-3-one at the frog neuromuscular junction, *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 606-616, doi: 10.1016/j.bbailip.2016.04.010.
111. Kasimov, M. R., Giniatullin, A. R., Zefirov, A. L., and Petrov, A. M. (2015) Effects of 5alpha-cholestan-3-one on the synaptic vesicle cycle at the mouse neuromuscular junction, *Biochim. Biophys. Acta*, **1851**, 674-685, doi: 10.1016/j.bbailip.2015.02.012.
112. Petrov, A. M., Mast, N., Li, Y., Denker, J., and Pikuleva, I. A. (2020) Brain sterol flux mediated by cytochrome P450 46A1 affects membrane properties and membrane-dependent processes, *Brain Commun.*, **2**, doi: 10.1093/braincomms/fcaa043.
113. Kobierski, J., Wnetrzak, A., Chachaj-Brekiesz, A., Filiczowska, A., Petelska, A. D., et al. (2021) How the replacement of cholesterol by 25-hydroxycholesterol affects the interactions with sphingolipids: The Langmuir Monolayer Study complemented with theoretical calculations, *J. R. Soc. Interface*, **18**, 20210050, doi: 10.1098/rsif.2021.0050.
114. Olsen, B. N., Schlesinger, P. H., Ory, D. S., and Baker, N. A. (2011) 25-Hydroxycholesterol increases the availability of cholesterol in phospholipid membranes, *Biophys. J.*, **100**, 948-956, doi: 10.1016/j.bpj.2010.12.3728.
115. Bielska, A. A., Olsen, B. N., Gale, S. E., Mydock-McGrane, L., Krishnan, K., et al. (2014) Side-chain oxysterols modulate cholesterol accessibility through membrane remodeling, *Biochemistry*, **53**, 3042-3051, doi: 10.1021/bi5000096.
116. Xu, X., and London, E. (2000) The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation, *Biochemistry*, **39**, 843-849, doi: 10.1021/bi992543v.
117. Olsen, B. N., Schlesinger, P. H., and Baker, N. A. (2009) Perturbations of membrane structure by cholesterol and cholesterol derivatives are determined by sterol orientation, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 4854-4865, doi: 10.1021/ja8095224.
118. Domingues, M. M., Gomes, B., Hollmann, A., and Santos, N. C. (2021) 25-hydroxycholesterol effect on membrane structure and mechanical properties, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, doi: 10.3390/ijms22052574.
119. Gomes, B., Goncalves, S., Disalvo, A., Hollmann, A., and Santos, N. C. (2018) Effect of 25-hydroxycholesterol in viral membrane fusion: Insights on HIV inhibition, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1860**, 1171-1178, doi: 10.1016/j.bbmem.2018.02.001.
120. Sibarov, D. A., Poguzhelskaya, E. E., and Antonov, S. M. (2018) Downregulation of calcium-dependent NMDA receptor desensitization by sodium-calcium exchangers: A role of membrane cholesterol, *BMC Neurosci.*, **19**, 73, doi: 10.1186/s12868-018-0475-3.

25-HYDROXYCHOLESTEROL AS A SIGNALING MOLECULE IN THE NERVE SYSTEM

Review

U. G. Odnoshivkina^{1,2#}, E. A. Kuznetsova^{1#}, and A. M. Petrov^{1,2*}

¹ *Laboratory of Biophysics of Synaptic Processes, Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC "Kazan Scientific Center of RAS", 420111 Kazan, Russia; e-mail: alexey.petrov@kazangmu.ru*

² *Kazan State Medical University, 420012 Kazan, Russia*

Cholesterol is an essential component of plasma membranes and precursor of biological active compounds, including hydroxycholesterols (HCs). HCs regulate cellular homeostasis of cholesterol and they, passing across membrane and vascular barriers, can act distantly as para- and endocrine agents. A small amount of 25-HC is produced in endoplasmic reticulum of most cells, where it serves as a potent regulator of cholesterol synthesis, its intracellular transport and storage. Production of 25-HC is greatly increased in macrophages, dendrite cells and microglia during triggering inflammatory reactions. Also, a synthesis of 25-HC can be upregulated at some neurological disorders, such as Alzheimer disease, amyotrophic lateral sclerosis, spastic paraplegia type 5 and X-linked adrenoleukodystrophy. However, it is unclear whether 25-HC aggravates the pathologies or has protective properties. Molecular targets for 25-HC are several transcriptional factors (LX-receptors, SREBP2, ROR), G-protein coupled receptor (GPR183), ion channels (NMDA-receptors, SLO1), adhesive molecules ($\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha v \beta 3$ integrins), and oxysterol-binding proteins. The diversity of 25-HC binding proteins points to the ability of the HC to affect many physiological and pathological processes. In the current review, we focused on the regulation of 25-HC production and its universal role in control of cellular cholesterol homeostasis, as well as the effects of 25-HC as a signaling molecule mediating an influence of inflammation on the processes in neuromuscular system and brain. Based on evidences collected, it can be considered that 25-HC prevents accumulation of cellular cholesterol and serves as a potent modulator of neuroinflammation, synaptic transmission and myelinization. Its enhanced production in response to a broad range of "injuries" can have a protective role, decreasing neuronal loss. Although, an "overdose" of 25-HC might exert neurotoxic effects.

Keywords: cholesterol, 25-hydroxycholesterol, liver X receptors, NMDA receptors, synaptic transmission, neuroinflammation, microglia

УДК 616.8;612.017

СЕМАФОРИН 3А В ИММУННОЙ СИСТЕМЕ: ДВАДЦАТЬ ЛЕТ ИЗУЧЕНИЯ

Обзор

© 2022 Е.П. Киселева^{1,2*}, К.В. Рутто¹

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,
197376 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: ekissele@yandex.ru

² Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова,
195067 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 19.02.2022

После доработки 15.05.2022

Принята к публикации 17.05.2022

Семафорин 3А — секретируемый гликопротеин, который первоначально был описан в нервной системе как фактор, направляющий рост аксонов, но он также является и иммунорегуляторным фактором. В обзоре приводится систематический анализ всех публикаций, имеющихся в доступной литературе за последние 20 лет, в которых изучалось действие семафорина 3А на Т-лимфоциты, миелоидные дендритные клетки и макрофаги. Детально описана экспрессия рецепторов семафорина 3А — нейропилина-1 и плексинов А-класса — на этих клетках. Данные, полученные на клетках человека и мыши, рассмотрены в сравнительном аспекте. Впервые представлена подробная характеристика действия семафорина 3А на клетки моноклеарно-фагоцитарной системы. Основной точкой приложения действия семафорина 3А является изменение цитоскелета и морфологии клетки, посредством чего осуществляется регуляция процессов миграции, адгезии и межклеточной кооперации клеток иммунной системы. Этот фактор контролирует различные этапы иммунного ответа, включающие фазу инициации иммунного ответа, презентацию антигена, функционирование эффекторных Т-клеток, фазу воспаления, активацию и поляризацию макрофагов. В последние годы интерес к семафорину 3А значительно возрос, поскольку было установлено, что он участвует в патогенезе многих заболеваний человека и может быть использован для их лечения в эксперименте. Изучение иммунорегуляторного действия семафорина 3А имеет важное значение, поскольку этот фактор и его рецепторы можно рассматривать в качестве перспективных мишеней для создания новых средств терапии аутоиммунных, аллергических и онкологических заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: семафорин 3А, нейропилин-1, плексин, Т-лимфоциты, дендритные клетки, макрофаги.

DOI: 10.31857/S0320972522060057, **EDN:** AUERQN

ВВЕДЕНИЕ

Первая работа по иммунорегуляторному действию семафорина 3А была опубликована чуть более 20 лет назад — в 2001 г. [1]. С тех пор этот фактор прочно занял одно из главных мест

среди так называемых иммунных семафоринов. За последние 10 лет интерес к этому белку значительно возрос: по данным базы PubMed ежегодно публикуется более 60 статей по семафорину 3А и более 120 — по его рецептору нейропилину-1 (Nrp-1). Повышенное внимание к этому фактору объясняется тем, что он участвует в патогенезе аутоиммунных, аллергических, а также онкологических заболеваний и может быть успешно использован для их лечения в эксперименте [2–4].

Семафорин 3А — гликопротеин, секретируемый многими клетками человеческого организма. С точки зрения иммунолога, это очень необычный фактор. Он является одновременно

Принятые сокращения: Ig-домен — иммуноглобулиноподобный домен; HGF — фактор роста гепатоцитов; KGF — фактор роста кератиноцитов; LPS — липополисахарид; M-CSF — макрофагальный колониестимулирующий фактор; Nrp-1 — нейропилин-1; PlexA — плексин класса А; PSI-домен — плексин-семафорин-интегриновый домен; Sema-домен — семафорин-интегриновый домен; TGF-β — трансформирующий фактор роста β; TLR — толл-подобный рецептор.

* Адресат для корреспонденции.

и нейрональным, и иммунорегуляторным фактором, а кроме того, проявляет ещё и анти-ангиогенную активность. Одной из характерных особенностей семафорина 3А является его способность оказывать хемореpellентное воздействие, при котором направленная миграция клеток происходит по отрицательному градиенту, т.е. в противоположную сторону от фактора.

Строение и характер функционирования семафорина 3А также заметно отличаются от других известных иммунорегуляторных молекул. Например, семафорин 3А имеет сходство в строении со своим рецептором, плексином, что предполагает их общее происхождение в эволюции. Для взаимодействия с клеткой семафорину 3А необходим не один, а два рецептора, объединённые в единый функциональный комплекс, голорецептор, в котором один из рецепторов — Nrp-1, связывает лиганд, а другой — плексин А-класса, осуществляет проведение сигнала.

Сигнальные пути тоже достаточно уникальны, поскольку плексин является единственным рецептором, содержащим GАР-домен. Он взаимодействует с G-белками, в результате чего осуществляется регуляция адгезии, миграции, пролиферации или выживания различных клеток.

В литературе можно найти немало обзорных публикаций, касающихся иммунорегуляторного действия семафорина 3А, однако одни из них посвящены семафоринам разных клас-

сов и рассматривают данный фактор довольно кратко [5–7], другие — описывают роль семафорина 3А в условиях патологии [2, 3], третьи — представляют данные только по его рецептору Nrp-1 [8, 9].

Настоящий обзор впервые целиком посвящён одному фактору — семафорину 3А и его главным образом физиологической роли в иммунной системе. Приводится систематический анализ всех публикаций, имеющихся в доступной литературе, в которых было изучено влияние семафорина 3А на Т-лимфоциты, миелоидные дендритные клетки и макрофаги. Детально описана экспрессия рецепторов семафорина 3А на этих клетках. Данные, полученные на клетках человека и мыши, рассмотрены в сравнительном аспекте. Впервые представлена подробная характеристика действия семафорина 3А на клетки моноклеарно-фагоцитарной системы.

КЛАССИФИКАЦИЯ

Семафорин 3А принадлежит к большому семейству семафоринов (коллапсинов), состоящему из 30 гликопротеинов, подразделяемых на 8 классов [5]. Первые два класса (1–2) обнаружены у беспозвоночных, классы 3–7 — у позвоночных (рыб, птиц, земноводных и млекопитающих), а V — представляет собой отдельный класс вирусных семафоринов. Семафорины не

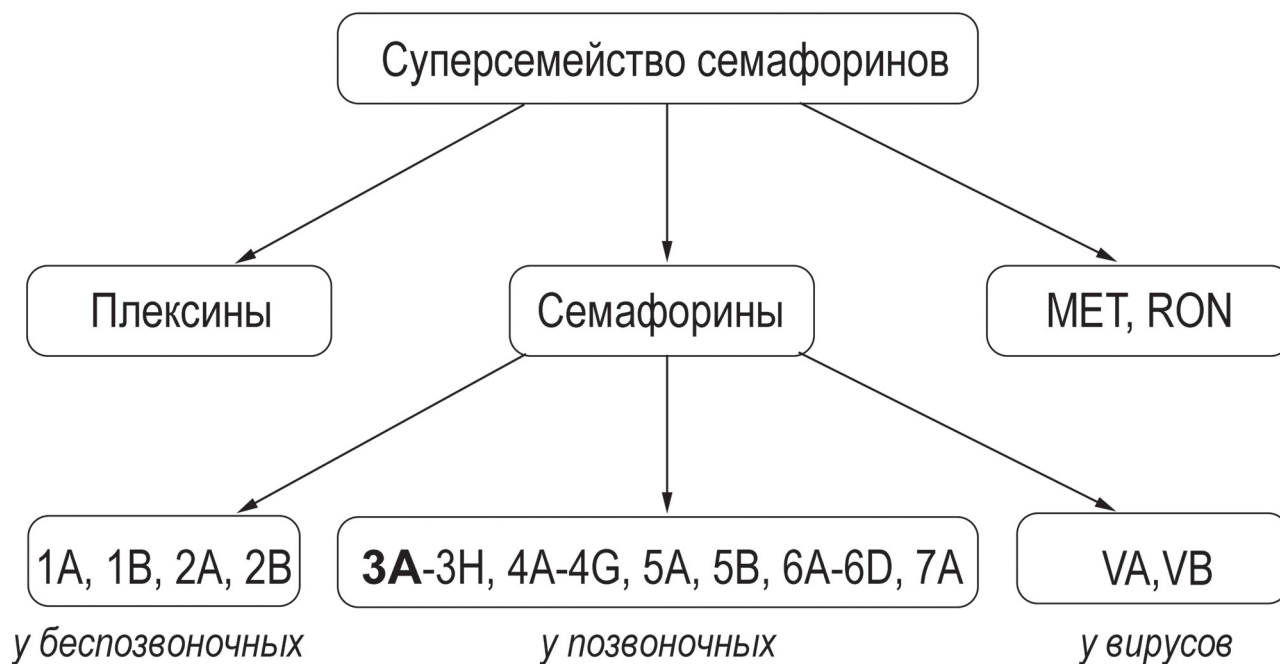


Рис. 1. Классификация семафоринов

встречаются у одноклеточных эукариот и прокариот.

Основным отличительным признаком семафоринов является наличие на *N*-конце молекулы высококонсервативного семафоринового домена (Sema-домена), который также имеется в составе плексинов (рецепторов семафоринов) и двух тирозинкиназных рецепторов MET и RON, являющихся рецепторами ростовых факторов — фактора роста гепатоцитов (HGF) и HGF-подобного фактора (HGF1) соответственно. Все три семейства белков (семафорины, плексины, а также MET и RON) образуют суперсемейство семафоринов (рис. 1).

Если *N*-концевая часть у всех семафоринов схожа по строению, то *C*-конец молекулы значительно различается, и от его строения зависит возможность связывания с клеточной мембраной. Семафорины могут быть секретлируемыми, трансмембранными или заякоренными на плазматической мембране.

Семафорины 3-класса отличаются от всех других семафоринов у позвоночных тем, что они являются секретлируемыми и имеют на *C*-конце молекулы основной, положительно заряженный, домен. Известно 7 белков 3-класса (3A–3H), из которых наиболее хорошо изучен семафорин 3A.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И СТРОЕНИЕ

Семафорины 3-класса были первоначально описаны как факторы, регулирующие направление роста аксонов. В 1990 г. из мозга эмбриона цыпленка был выделен белок, который вызывал коллапс конусов роста нейронов в культуре, он получил название коллапсин-1 [10] и позднее был переименован в семафорин 3A.

Семафорин 3A представляет собой гомодимер, состоящий из мономеров с молекулярной массой 110 кДа, имеющих мультидоменное строение. Каждый мономер состоит из 4 доменов.

На *N*-конце молекулы семафорина 3A, как и у всех семафоринов, имеется Sema-домен. Он состоит из 500 аминокислот, имеет форму 7-лопастного β -пропеллера, богат дисульфидными связями. Топологическая структура в виде β -пропеллера широко распространена среди различных внеклеточных и цитозольных белков, однако β -пропеллер семафоринов является самой большой из известных молекул подобного рода.

Рядом с Sema-доменом расположен небольшой богатый цистеином плексин-семафорин-интегриновый (PSI) домен, за которым следует иммуноглобулиноподобный (Ig) домен. На *C*-конце молекулы находится основной (basic) домен.

Sema-домен важен для передачи сигнала и биологической специфичности семафорина, связанные дисульфидным мостиком Ig-домены физически стабилизируют гомодимерную молекулу, а *C*-конец определяет сродство к рецептору — Nrp-1 [3, 5, 6].

РЕЦЕПТОРЫ СЕМАФОРИНА 3A

Семафорин 3A взаимодействует с клетками через функциональный рецепторный комплекс, состоящий из Nrp-1 и плексина класса A (PlexA).

Nrp-1 (CD304) — трансмембранный белок с молекулярной массой 120–130 кДа. Внеклеточная часть нейропилина-1 содержит два комплементсвязывающих домена — a1/a2 (CUB-домен), два домена, гомологичных факторам свёртывания V/VIII — b1/b2, и c-домен (MAM, меприн) (рис. 2). Nrp-1 имеет короткий цитоплазматический домен (около 40 аминокислот), не имеющий явных сигнальных последовательностей, поэтому для передачи сигнала необходимо образование комплекса Nrp-1 с плексином класса A (PlexA1–A4).

В данном комплексе Nrp-1 выступает в роли рецептора, связывающего семафорин 3A, а плексин — передает сигнал в клетку. При проведении сигнала от семафорина 3A формируется голорецептор — гетеротетрамер, состоящий из двух молекул Nrp-1 и двух молекул PlexA, которые объединены в единый функциональный комплекс с помощью гомодимерной молекулы семафорина 3A [11]. При этом оба PlexA могут быть гомологичными (например, димер плексинов PlexA2) или гетерологичными (например, PlexA1 и PlexA4) в зависимости от степени их экспрессии в клетке [3]. Они даже могут заменять друг друга в рецепторном комплексе, проявляя при этом высокую пластичность при проведении сигнала в разных условиях.

Плексины класса A представляют собой большие трансмембранные гликопротеины с молекулярной массой около 200 кДа, состоящие из двух частей — внеклеточной и внутриклеточной. Внеклеточная часть PlexA по строению схожа с семафорин 3A и состоит из *N*-конце-

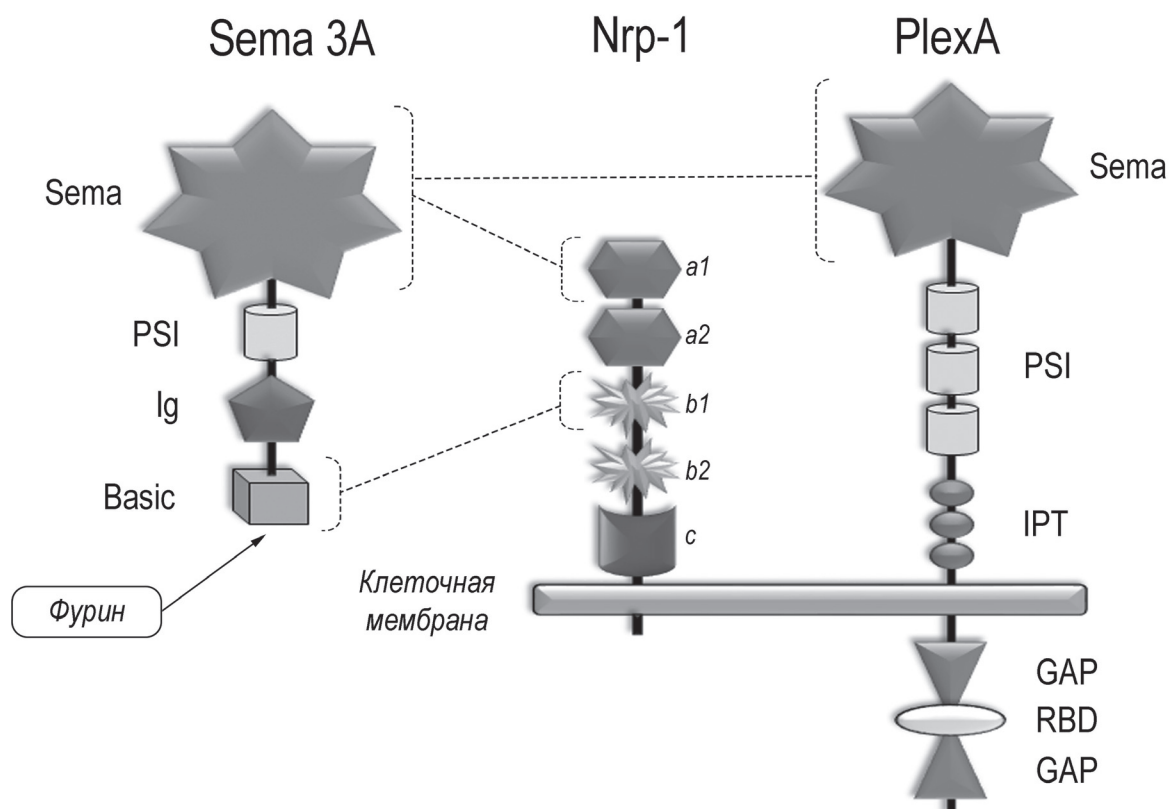


Рис. 2. Строение семафорина 3А (Sema 3A) и его рецепторов Nrp-1 и PlexA. Взаимодействия между молекулами показаны пунктиром (пояснения в тексте)

вого Sema-домена, к которому присоединены три PSI-домена; за ними следуют три IPT-домена (иммуноглобулин-плексин-транскрипционный фактор).

При взаимодействии семафорина 3А с Nrp-1 происходит дивалентное связывание Sema-домена семафорина 3А с a1-доменом Nrp-1 (с низкой аффинностью) и основного (basic) домена семафорина 3А с b1-доменом Nrp-1 (с высокой аффинностью) (рис. 2). Причём последнее осуществляется только после воздействия на семафорин 3А тканевой эндопептидазы — фурина [12]. Протеолитическая обработка ферментом является важным этапом созревания молекул семафоринов 3-класса, которые синтезируются в неактивной форме. В результате протеолиза на С-конце семафорина высвобождается концевой аргинин, необходимый для взаимодействия с b1-доменом Nrp-1.

Семафорин 3А не может связываться с молекулой плексина с высокой аффинностью, однако описана возможность низкоаффинного взаимодействия Sema-доменов плексина и семафорина 3А («голова к голове»), способствующего димеризации и активации рецептора [12].

ПРОВЕДЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СИГНАЛА

Цитоплазматический сегмент PlexA не содержит тирозинкиназного домена, характерного для рецепторов ростовых факторов, но содержит высококонсервативный GAP-домен (белок, активирующий или связывающий ГТФазу). Он относится к регуляторным белкам, которые могут связываться с активированными G-белками и стимулировать их ГТФазную активность, т.е. ускорять процесс дефосфорилирования ГТФ с образованием ГДФ, в результате чего сигнальное событие прекращается.

Цитоплазматический фрагмент плексинов А обладает способностью активировать мономерные малые ГТФазы, G-белки, принадлежащие двум семействам Ras и Rho. Они представляют собой сигнальные молекулы, регулирующие адгезию, миграцию, пролиферацию, дифференцировку и выживание клеток. Проведение сигнала от комплекса семафорина 3А с рецепторами наиболее подробно изучено в нервной системе, и показано, что в нём участвуют молекулы R-Ras, M-Ras и Rap, принад-

лежащие к семейству Ras, а также RhoA, Rac1 и Rnd — из семейства Rho.

ГТФазы Ras и Rap воздействуют на функцию интегрина и контролируют клеточную адгезию, Rho-белки влияют на морфологию и подвижность клетки, и так же, как и Ras-белки, играют важную роль в перестройке актинового цитоскелета [5]. Активация R-Ras и Rap1 может запускать различные ингибиторные эффекты семафорина 3А в нервной и сосудистой тканях [5, 12]. В иммунной системе активация Rap1 участвует в подавлении семафорин 3А пролиферации Т-лимфоцитов человека [13] (таблица).

В неактивном состоянии два GAP-домена разделены RBD-доменом, который сам является Rho-связывающей ГТФазой (Rho-GTPase binding domain) (рис. 2). При взаимодействии с семафорин 3А происходит связывание RBD-домена с Rho-ГТФазами, в результате чего происходят конформационные изменения, которые позволяют разделённым частям GAP взаимодействовать и активироваться. Таким образом, и RBD-, и GAP-домены взаимодействуют со своими G-белками, запуская сложные каскады проведения внутриклеточного сигнала, приводящие не только к ингибиторным, но и к активирующим эффектам.

С участием Rho-связывающих ГТФаз осуществляются PlexA1-опосредованные изменения цитоскелета дендритных клеток, необходимые для их способности активировать Т-лимфоциты [14], а также PlexA4-опосредованная активация провоспалительной активности макрофагов в присутствии липополисахарида (LPS) [15] (таблица). Кроме того, через RhoA—ROCK (Rho-associated coiled-coil-forming serine/threonine specific protein kinase) сигнальный путь под действием семафорина 3А происходит усиление миграции дендритных клеток [16] и макрофагов [17]. В том случае, если Rho-связывающие ГТФазы активируются другим фактором, например, макрофагальным колониестимулирующим фактором (M-CSF), семафорин 3А может подавлять этот эффект и ингибировать миграцию макрофагов [18].

Во всех перечисленных, а также во многих других случаях основными мишенями действия семафорина 3А являются актиновый цитоскелет и фокальная адгезия. Их изменения влияют на морфологию клеток, межклеточные взаимодействия, адгезию и миграцию Т-лимфоцитов [19–21] и дендритных клеток [14, 16, 22].

Кроме активации малых ГТФаз, в нервных клетках описаны также и другие пути проведения сигнала, которые мало изучены в клетках иммунной системы. Действие семафорина 3А на клеточный цитоскелет может осуществляться путём взаимодействия цитоплазматического конца PlexA с двумя группами молекул — белками семейства MICAL (molecules interacting with CasL) и нерецепторными внутриклеточными тирозинкиназами Fes и Fyn [3]. Белки семейства MICAL являются ферментами, обладающими монооксигеназной активностью, благодаря чему они окисляют актин и вызывают диссоциацию актиновых нитей. Кроме того, белки MICAL и тирозинкиназы Fes и Fyn могут приводить к фосфорилированию сигнальной

Участие малых ГТФаз в передаче сигнала, запускаемого семафорин 3А в клетках иммунной системы

Рецептор из комплекса Nrp-1/PlexA	Клетка	Сигнальные молекулы	Функция	Ссылка
Nrp-1	Т-лимфоциты человека	Rap1	подавление пролиферации и синтеза цитокинов	[13]
PlexA1	дендритные клетки мыши	Rho/ROCK-киназа	поддержание способности дендритных клеток активировать Т-лимфоциты*	[14]
PlexA4	макрофаги мыши	Rac1	усиление синтеза провоспалительных цитокинов, индуцированного LPS	[15]
Nrp-1/PlexA1	дендритные клетки мыши	RhoA/ROCK-киназа	усиление трансмиграции через лимфатический эндотелий	[16]
Nrp-1	макрофаги мыши	RhoA/ROCK-киназа	стимуляция миграции макрофагов	[17]
Nrp-1	макрофаги мыши	подавление RhoA-пути, активированного M-CSF	подавление миграции, индуцированной M-CSF	[18]

Примечание. * Непосредственное участие семафорина 3А не показано, но предполагается.

молекулы CRMP2 (collapsin response mediator protein 2), что вызывает деполимеризацию тубулина и подавляет сборку микротрубочек. Тем самым оказывается влияние на морфологию клетки и направление роста аксонов [5].

CRMP2 присутствует в цитоплазме CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, а также моноцитов крови человека [23]. CRMP2 играет существенную роль в биполярной реорганизации цитоскелета при спонтанной и хемокин-индуцированной миграции Т-лимфоцитов, однако не участвует в проведении сигнала от семафорина 3А, который подавляет миграцию этих клеток [23].

Возможны и другие механизмы воздействия семафорина 3А на клетку, связанные, в частности, с развитием апоптоза. Показано, что этот фактор усиливает апоптоз в Т-клеточных линиях [24], а также в макрофагах человека [25] и крысы, что происходит с участием каспаз [26].

ДРУГИЕ ФУНКЦИИ РЕЦЕПТОРОВ (НЕ СВЯЗАННЫЕ С СЕМАФОРИНОМ 3А)

Nrp-1 является многофункциональным трансмембранным белком, который способен взаимодействовать с большим числом структурно неродственных лигандов. Nrp-1 через b1/b2-домены может взаимодействовать со многими ростовыми факторами, такими как ростовой фактор сосудистого эндотелия (VEGF), трансформирующий фактор роста β (TGF- β), плацентарный фактор роста (PLGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор роста кератиноцитов (KGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF-D) и др. При этом Nrp-1 образует с тирозинкиназными рецепторами этих факторов функциональные комплексы (гоloreцепторы) и влияет на передачу сигнала [3, 8].

Лигандами Nrp-1 также являются гепарин и гепарансульфат, галектин-1 и микроРНК [7, 8]. Nrp-1 был идентифицирован в качестве рецептора C4d, C3d и iC3b — компонентов комплемента, связывание с которыми осуществляется через b1-домен [27]. Недавно было показано, что Nrp-1 взаимодействует с S-белком вируса SARS-CoV-2 и способствует заражению клетки [28]. Все вышесказанное позволяет охарактеризовать Nrp-1, как многофункциональный узловой координирующий рецептор (scaffold receptor) [3].

Плексины А-класса также не являются рецепторами, специфичными для проведения сигнала только от семафорина 3А. Они могут

взаимодействовать с другими семафоринами 3-класса, а именно: с семафоринами 3В и 3С [3], а также с семафоринами 6-класса [5, 29].

Некоторые плексины, независимо от присутствия семафорина 3А, могут участвовать в процессах активации и дифференцировки макрофагов. Так, по неизвестному механизму PlexA4 вовлечён в проведение сигнала от толл-подобных рецепторов (TLRs) [15], а PlexA1 участвует в дифференцировке остеокластов под действием RANKL [18] (см. раздел, посвящённый макрофагам).

Ещё одно уникальное свойство Nrp-1 и плексинов А-класса — это возможность функционирования в качестве самостоятельных адгезионных молекул. Nrp-1 и PlexA первоначально были описаны как адгезионные молекулы [30, 31]. На различных клетках, не принадлежащих к иммунной системе, показано, что Nrp-1 взаимодействует с интегринами (β 1, α V β 3 и α 5 β 1) и другими адгезионными молекулами (например, L1-CAM, L1-cell adhesion molecule), находящимися латерально на мембране той же клетки, и влияет на процессы адгезии к внеклеточному матриксу и миграции [3, 9, 32]. В иммунной системе Nrp-1 и PlexA1, также независимо от присутствия семафорина 3А, принимают участие в адгезии тимоцитов к эпителиальным клеткам тимуса мыши [33].

Вызывают большой интерес сведения об участии Nrp-1 и PlexA1 в образовании иммунного синапса между наивными Т-лимфоцитами и антиген-презентирующими клетками. Оба рецептора выявляются в зоне контакта как со стороны дендритных клеток, так и Т-лимфоцитов человека [19, 20, 34] и мыши [14, 35]. Описана возможность гомофильного взаимодействия между двумя молекулами Nrp-1, одна из которых находится на Т-лимфоците, а другая — на дендритной клетке; блокирующие антитела к Nrp-1 подавляют образование конъюгатов между ними [34]. Nrp-1 пролонгирует контакт между Т-регуляторными и антиген-презентирующими клетками [35], поддерживает стабильность и функционирование Т-регуляторных клеток [36], а также способствует проведению сигнала от TGF- β , являющегося ключевым фактором их индукции [37].

Таким образом, Nrp-1 и PlexA являются не только рецепторами семафорина 3А, но и способны участвовать в осуществлении межклеточных контактов в иммунной системе в качестве самостоятельных молекул при отсутствии своего основного лиганда.

ЭКСПРЕССИЯ СЕМАФОРИНА 3А В ОРГАНИЗМЕ

Семафорин 3А играет важную роль в эмбриогенезе и участвует в формировании жизненно важных систем, таких как центральная нервная система, сердечно-сосудистая, бронхолёгочная, выделительная, костная и иммунная.

Во взрослом организме семафорин 3А участвует в функционировании и поддержании гомеостаза многих органов, принимает участие в различных регенераторных процессах. Он экспрессируется в нервной, лимфоидной, костной, жировой и соединительной тканях, сосудистом эндотелии, эпителии кишки и носоглотки человека [6].

В иммунной системе человека семафорин 3А синтезируется активированными $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитами [13, 38], Т-регуляторными [38, 39] и В-регуляторными $CD19^+CD25^{high}$ клетками [2], а также макрофагами [19, 25, 38] и дендритными клетками [19, 20]. У мышей показана экспрессия мРНК семафорина 3А в Т- и В-лимфоцитах, НК-клетках, макрофагах и дендритных клетках [15].

Мишенями действия семафорина 3А в иммунной системе, экспрессирующими на своей поверхности рецепторный комплекс, состоящий из Nrp-1 и плексинов класса А, являются Т-лимфоциты, мононуклеарные фагоциты и дендритные клетки [4].

Т-ЛИМФОЦИТЫ

Основным иммунологическим эффектом семафорина 3А считается его супрессорное действие в отношении Т-лимфоцитов. Предполагают, что биологическая роль семафорина 3А — это осуществление негативного контроля [19], который заключается в селективном подавлении функций активированных Т-лимфоцитов, экспрессирующих в данный момент рецепторы семафорина 3А.

Методом проточной цитометрии Nrp-1 практически не выявляется (0,1–0,5%) на мононуклеарах крови человека, а также на $CD4^+$, $CD8^+$ или $CD3^+$ Т-лимфоцитах крови [20, 40–42], но обнаруживается в небольшом количестве на Т-лимфоцитах, полученных из вторичной лимфоидной ткани — периферических лимфоузлов (2,6%) и миндалин (5,4%) [40]. Процент выявления клеток Nrp-1⁺ становится значительно больше при патологии, что было

отмечено среди $CD4^+$ Т-лимфоцитов крови [38] и $CD3^+$ Т-клеток синовиальной ткани у больных ревматоидным артритом [43], а также среди $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов, выделенных из различных опухолей человека [21, 41, 42].

Эти данные позволили ряду авторов высказать предположение о том, что Nrp-1 является активационным маркером Т-лимфоцитов человека [40, 41]. Nrp-1 коэкспрессируется на поверхности Т-лимфоцитов с другими активационными молекулами и, в частности, с молекулой CD25, что было показано для $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, выделенных из опухолей [41, 42]. Кроме того, экспрессия Nrp-1 повышается на Т-лимфоцитах крови при активации с помощью анти-CD3/CD28 антител *in vitro* [38, 40].

У мышей на покое Т-лимфоцитах крови, селезёнки и лимфоузлов Nrp-1 также практически не выявляется [35, 44], но присутствует на $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитах, выделенных из опухолей [21, 41] и $CD8^+$ Т-лимфоцитах, активированных пептидами [21].

Поверхностная экспрессия PlexA1 на неактивированных Т-лимфоцитах человека также слабо выражена, рецептор локализуется в основном внутриклеточно, однако при взаимодействии с дендритными клетками перемещается в зону контакта и выявляется на 50% Т-клеток, образующих конъюгаты [20]. На поверхности неактивированных Т-лимфоцитов обнаружен также и PlexA4 [20]. Экспрессия мРНК генов, кодирующих PlexA1 и PlexA4, значительно выше в $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитах, полученных из крови больных ревматоидным артритом, чем от здоровых доноров [38].

У мышей наблюдается та же закономерность — низкая экспрессия генов, кодирующих PlexA1 [35, 45], PlexA2 и PlexA4 в неактивированных Т-клетках [15, 21, 46], и значительное усиление мембранной экспрессии генов, кодирующих PlexA1, при активации $CD8^+$ Т-клеток пептидами [21].

Таким образом, семафорин 3А не может взаимодействовать с покоящимися клетками, но приобретает способность оказывать воздействие на активированные Т-лимфоциты.

Nrp-1 и PlexA1 у человека участвуют в образовании иммунного синапса со стороны Т-лимфоцитов, причём и Nrp-1 [34], и PlexA1 колокализуются с CD3 [20]. Добавление экзогенного семафорина 3А подавляет транслокацию CD3 в зону контакта, вызывает кратковременную потерю F-актина и микроворсинок в Т-лимфоцитах, снижает частоту образования конъюгатов

между ними и дендритными клетками [20], хотя в другом сообщении влияние семафорина 3А на образование конъюгатов не подтверждено [19]. В Т-клетках происходит реорганизация актинового цитоскелета и перераспределение талина, нарушаются поляризация Т-клеточного рецептора (TCR) и передача от него сигнала, подавляется фосфорилирование ZAP-70 и FAK (focal adhesion kinase) киназ. Это приводит к ингибированию пролиферации Т-лимфоцитов, индуцированной контактом с дендритными клетками [19].

Источником семафорина 3А в данном случае являются активированные дендритные клетки, участвующие в презентации антигена. В супернатантах смешанной аллогенной культуры дендритных клеток и Т-лимфоцитов человека семафорин 3А появляется в небольших количествах (5 нг/мл) уже через 1 сутки, после чего его концентрация возрастает до 60 нг/мл на 4–6 сутки, что было показано с помощью ИФА [19]. В другой работе в аналогичных условиях семафорин 3А был обнаружен методом иммунопреципитации на 3 сутки [20]. Иммуносупрессорное действие эндогенного семафорина 3А (подавление пролиферации Т-лимфоцитов в смешанной аллогенной культуре) можно заблокировать с помощью моноклональных антител к этому фактору [19].

Помимо подавления активации на начальном этапе, семафорин 3А оказывает негативное воздействие и на другие функции Т-лимфоцитов, такие как пролиферация и синтез цитокинов. В экспериментах *in vitro* показано, что семафорин 3А ингибирует пролиферативную активность Т-лимфоцитов человека, индуцированную анти-CD3/CD28 антителами [13, 19], но не влияет на пролиферацию, индуцированную РНА/IL-2 [19] или фоболовым эфиром [13]. Подавление пролиферации в Т-лимфоцитах сопровождается индукцией синтеза молекулы p27^{kip1}, являющейся негативным регулятором клеточного цикла. В мононуклеарах крови человека, стимулированных анти-CD3/CD28 антителами, происходит также и снижение синтеза цитокинов, таких как IL-2, IL-4, IL-10 и IFN- γ [13, 38]. Действие семафорина 3А на Т-клетки связано с ингибированием активации ERK1/2-киназ и блокадой Ras/MAPK (mitogen activated protein kinase) сигнального пути через активацию ГТФазы Rap1 [13].

Семафорин 3А оказывает негативный эффект в отношении Т-системы лимфоцитов и у мышей. У животных с дефицитом семафо-

рина 3А (Sema 3A^{-/-}), а также его рецепторов — плексина А4 (PlexA4^{-/-}) или нейропилина-1 (с мутацией рецептора, не позволяющей ему взаимодействовать с семафорином 3А, Nrp-1^{Sema-}) наблюдается гиперпролиферативный ответ Т-лимфоцитов на антигенную или анти-CD3 стимуляцию *in vitro* [46]. Т-лимфоциты от мышей с дефицитом PlexA4 проявляют повышенную способность к синтезу провоспалительных цитокинов IFN- γ и IL-17 в ответ на стимуляцию. Авторы считают, что PlexA4 у мышей является основным плексиновым рецептором Т-лимфоцитов, проводящим негативный сигнал от семафорина 3А [46].

В литературе также имеются данные об ингибирующем влиянии семафорина 3А на миграцию и адгезию Т-лимфоцитов. Показано, что этот фактор подавляет миграцию Т-лимфоцитов крови человека, предварительно активированных с помощью РНА и IL-2 [23], но при этом не влияет на скорость миграции неактивированных Т-лимфоцитов в присутствии хемокинов [20]. Кроме того, семафорин 3А ингибирует адгезию Т-лимфоцитов к опухолевым клеткам [13] и цитотоксическую активность лимфоцитов из смешанных лимфоцитарных культур (MLC) в отношении клеток K562 [13]. У мышей семафорин 3А парализует CD8⁺ Т-лимфоциты — вызывает блокаду актинового цитоскелета, приводящую к подавлению их миграции, адгезии и цитотоксического действия на опухолевые клетки [21, 41].

Кроме того, данный фактор повышает чувствительность клеток к развитию Fas-опосредованного апоптоза, что было показано на Т-клеточных линиях лейкоза человека. При этом через PlexA1 оказывается воздействие на белки, регулирующие активность актина, происходит перестройка цитоскелета и транслокация Fas в область липидных рафтов [24].

Помимо прямого действия на Т-лимфоциты, семафорин 3А может подавлять их активность через Т-регуляторные клетки. Эти клетки экспрессируют транскрипционный фактор Foxp3 (forkhead box p3) и обладают способностью ингибировать функции эффекторных Т-лимфоцитов путём продукции противовоспалительных цитокинов, таких как TGF- β и IL-10. Ряд исследователей считает, что семафорин 3А также является супрессорным медиатором Т-регуляторных клеток человека [38, 39]. Он не только ими синтезируется, но и повышает в них экспрессию Foxp3 [39], а также продукцию IL-10, что приводит к уси-

лению супрессорной активности CD4⁺ Nrp-1⁺ T-reg-подобных клеток [38].

Поскольку Nrp-1 на CD3⁺CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ T-регуляторных клетках крови практически отсутствует, но определяется на клетках, полученных из вторичной лимфоидной ткани — лимфатических узлов и миндалин [40, 47], было высказано предположение о том, что Nrp-1 маркирует особую субпопуляцию T-регуляторных клеток человека. Эти клетки обладают наиболее выраженной супрессорной способностью и выявляются не в крови, а в тканях, особенно в условиях воспалительного микроокружения [8, 48]. Их обнаруживают в синовиальной жидкости у больных ревматоидным артритом [49], в бронхиальном лаваже пациентов с хроническими обструктивными заболеваниями лёгких [50], в первичных опухолях и лимфогенных метастазах [42, 47, 48].

В то же время у мышей экспрессия Nrp-1 на T-регуляторных клетках существенным образом отличается от таковой у человека. У этих животных Nrp-1 высоко экспрессируется на CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ клетках крови, а также селезёнки, тимуса и лимфатических узлов [40] и рассматривается, как важный функциональный маркер T-регуляторных клеток [35]. Его экспрессия тесно коррелирует с экспрессией Foxp3 и супрессорной функцией T-регуляторных клеток у мышей [51]. Причём считается, что экспрессия Nrp-1 является характерным признаком тимусных, а не индуцированных на периферии T-регуляторных клеток [52].

Если удалить ген, кодирующий Nrp-1 с помощью кондиционного нокаута в T-клетках, то ни содержание T-регуляторных клеток в селезёнке мышей [44], ни экспрессия в этих клетках Foxp3 не изменятся [53]. Однако в них обнаружится существенный функциональный дефект — снижение способности подавлять пролиферацию эффекторных CD4⁺ T-клеток *in vivo* и *in vitro*. При этом CD4⁺ T-клетки будут дифференцироваться предпочтительно по Th17-пути иммунного ответа. Отсутствие Nrp-1 в T-регуляторных клетках мышей предрасполагает к развитию аутоиммунных заболеваний [53]. Как считают некоторые исследователи, Nrp-1 не вовлечён в T-клеточный гомеостаз в нормальных условиях, однако его роль существенно возрастает при патологии [21].

Таким образом, семафорин 3A в настоящее время рассматривается как эндогенный иммуносупрессорный фактор для T-лимфоцитов. При этом он избирательно действует лишь на

небольшую часть клеток, несущих соответствующие рецепторы, в том числе и на T-регуляторные лимфоциты, которые потенцируют его ингибирующее влияние на эффекторные клетки. Семафорин 3A осуществляет своё подавляющее действие на активированные T-лимфоциты через рецепторы Nrp-1, PlexA1 и PlexA4 с использованием блокады ERK1/2-киназ и Ras/MAPK-сигнального пути.

Помимо клеток периферической иммунной системы, экспрессия семафорина 3A была также обнаружена и в центральном органе иммуногенеза — тимусе. Этот фактор конститутивно синтезируется стромальными клетками тимуса человека [54] и мыши [55]. *In vitro* было показано, что семафорин 3A оказывает ряд негативных эффектов в отношении тимоцитов и эпителиальных клеток — ингибирует адгезию тимоцитов человека к эпителиальным клеткам [54], а также миграцию тимоцитов, индуцированную хемокином SDF-1/CXCL12. При этом нейрональный фактор снижает экспрессию рецептора SDF-1 и подавляет фосфорилирование FAK- и ZAP-70-киназ в мигрирующих клетках, что указывает на существование функционального антагонизма между SDF-1 и семафорин 3A [56]. Кроме того, этот фактор ингибирует пролиферативную активность тимоцитов [57] и эпителиальных клеток тимуса мыши [58]. Причём в последнем случае семафорин 3A способен отменять стимулирующий эффект ростовых факторов KGF и HGF на пролиферацию эпителиальных клеток, что позволяет его рассматривать в качестве потенциального антагониста также и этих двух факторов.

ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ

Дендритные клетки не только активно синтезируют семафорин 3A, но и сами являются мишенью действия семафорина, продуцируемого другими клетками. В отличие от супрессорного действия в отношении T-лимфоцитов, семафорин 3A стимулирует функциональную активность дендритных клеток и играет важную роль в инициации иммунного ответа. При этом нейрональный фактор действует достаточно избирательно и влияет главным образом на миграцию дендритных клеток и, возможно, на их контакт с T-лимфоцитами, не затрагивая при этом собственно процесс презентации антигена.

В данный обзор включены работы по изучению миелоидных дендритных клеток, которые

получали из костного мозга мышей или моноцитов крови человека и инкубировали в присутствии цитокинов GM-CSF и IL-4 (незрелые дендритные клетки) с последующей активацией с помощью LPS, TNF или анти-CD40 (зрелые дендритные клетки).

В незрелых дендритных клетках человека экспрессия мРНК семафорина 3А слабо выражена, а в зрелых, активированных с помощью LPS, TNF- α /IL-1 β или CD40L, экспрессия значительно усиливается [19, 22]. У мышей дендритные клетки также экспрессируют мРНК семафорина 3А [15].

Для взаимодействия с семафорин 3А дендритные клетки человека экспрессируют соответствующие рецепторы. Моноциты крови не экспрессируют Nrp-1 [19, 22] и очень слабо экспрессируют PlexA1 и PlexA3 [22]. В процессе дифференцировки моноцитов в незрелые дендритные клетки экспрессия всех трёх рецепторов заметно усиливается [22, 34]. Однако при дальнейшем созревании дендритных клеток в присутствии LPS мембранная экспрессия Nrp-1 и PlexA1 снижается, что происходит путём эндоцитоза рецепторов. При этом экспрессия Nrp-1 на уровне мРНК также снижается, а PlexA1 — не меняется [20, 22].

На дендритных клетках мышей также обнаружен Nrp-1 [16, 44]. Из плексинов экспрессируется главным образом мРНК PlexA1, а мРНК других плексинов А-класса слабо выражена [29]. В отличие от клеток человека, по мере созревания дендритных клеток мышей в присутствии LPS или TNF экспрессия обоих рецепторов — Nrp-1 [16, 44] и PlexA1, как мембранная, так и на уровне мРНК, усиливается [14, 16, 45]. При этом цитоплазматическая локализация PlexA1 переходит в мембранную форму [14].

Значительные межвидовые различия в экспрессии рецепторов семафорина 3А между человеком и мышью характерны не только для дендритных клеток, но наблюдаются также в тимоцитах [57, 59] и периферических Т-лимфоцитах [40].

PlexA1 является основным плексиновым рецептором дендритных клеток. Его высокая экспрессия является отличительной особенностью дендритных клеток по сравнению с другими антиген-презентирующими клетками, в частности макрофагами [45].

Другой рецептор — PlexA4, не играет существенной роли в презентации антигена и способности дендритных клеток мышей активи-

ровать Т-лимфоциты [15]. Дефицит PlexA4 не влияет на экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости МНС-II и костимулирующих молекул дендритными клетками и даже усиливает их способность активировать пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов [46]. Однако PlexA4 всё же принимает участие в регуляции некоторых функций дендритных клеток, в частности синтеза цитокинов. Дендритные клетки, полученные от мышей PlexA4^{-/-} и активированные с помощью LPS, обладают сниженной способностью синтезировать TNF- α и IL-6 [15], хотя продукция IL-12 p40 в аналогичных условиях не снижалась [46].

Наиболее детально изучен вопрос о влиянии семафорина 3А на миграцию дендритных клеток из периферических тканей в регионарные лимфоузлы [16]. Оказалось, что нагруженные антигеном дендритные клетки, полученные от мышей с дефицитом PlexA1 (PlexA1^{-/-}) или с функциональным дефектом Nrp-1 (Nrp-1^{Sema-}), аккумулируются в дренирующих лимфатических узлах в значительно меньшем количестве, чем клетки, полученные от мышей дикого типа. Аналогичный эффект наблюдали и в том случае, если дендритные клетки от мышей дикого типа вводили в организм животных с дефицитом семафорина 3А. При детальном изучении механизма данного явления оказалось, что семафорин 3А, продуцируемый клетками лимфатического эндотелия, необходим для трансмиграции дендритных клеток в эфферентные лимфатические сосуды. Этот фактор проявляет в отношении дендритных клеток хемореpellентное действие, повышает их подвижность и скорость движения, что показано *in vitro* в присутствии хемокинов, а также усиливает собственно процесс трансмиграции через монослой лимфатического эндотелия.

Основной точкой приложения семафорина 3А в этом случае является перестройка актинового цитоскелета. Известно, что для клетки, движущейся по хемокиновому градиенту, характерно состояние поляризации, при этом экспрессия рецепторов на переднем и заднем её концах может быть различной. Оказалось, что семафорин 3А действует через PlexA1, находящийся на хвостовой части дендритной клетки, и вызывает сокращения актомиозина, что способствует прохождению клеток через узкие щели. При этом через форфорилирование лёгких цепей миозина происходит воздействие на миозин II, а в проведении сигнала участвуют ROCK-киназа и ГТФаза RhoA [16].

Усиление миграции по типу хемореппелленции под действием семафорина 3А было показано и в отношении дендритных клеток человека в присутствии хемокина CCL19 или без него [22]. При этом наблюдали реорганизацию цитоскелета и полярное перераспределение F-актина в фокальные зоны, совпадающие с ламеллами, что характерно для морфологии мигрирующей клетки.

На этапе презентации антигена прямое воздействие семафорина 3А на дендритные клетки не установлено, однако показано, что PlexA1 и Nrp-1 у мышей являются компонентами иммунного синапса и локализуются в зоне контакта со стороны дендритных клеток [14, 35]. Дендритные клетки, полученные от мышей с дефицитом PlexA1 (PlexA1^{-/-}), обладают сниженной способностью активировать антиген-специфические или аллогенные Т-клетки *in vivo* и *in vitro* [29, 45]. При этом снижение экспрессии PlexA1 не влияет на захват и процессирование антигена, экспрессию молекул МНС классов I и II, а также костимулирующих молекул CD40, CD80 и CD86 на мембране дендритных клеток [14, 16, 29, 45]. Присутствие в них PlexA1 необходимо для перестройки актинового цитоскелета в зоне их контакта с Т-лимфоцитами и активации в дендритных клетках Rho ГТФаз; нокдаун гена, кодирующего PlexA1 в дендритных клетках, подавляет их способность антиген-специфически активировать Т-лимфоциты [14].

Похожие данные были также получены на клетках человека. С помощью иммунофлуоресцентной и сканирующей микроскопии было показано, что Nrp-1 и PlexA1 являются компонентами иммунного синапса со стороны дендритных клеток и у человека [20, 34]. Добавление антител, блокирующих PlexA1 [20] или Nrp-1 [34], в смешанную аллогенную культуру подавляло способность зрелых дендритных клеток активировать пролиферативный ответ Т-лимфоцитов.

В чем заключается биологическое значение присутствия рецепторов семафорина 3А на мембране дендритных клеток в иммунном синапсе, пока не ясно. Предполагают, что присутствие PlexA1 может влиять на процесс адгезии (или деадгезии), формирование дендритов и на способность дендритных клеток взаимодействовать с большим числом Т-лимфоцитов [14].

Таким образом, дендритные клетки являются мишенью действия семафорина 3А на ранних этапах иммунного ответа, и этот фактор оказывает на них стимулирующее действие, спо-

собствуя их миграции в лимфатический узел. В отличие от Т-лимфоцитов, у которых взаимодействие с семафоринами 3А реализуется через два плексиновых рецептора, PlexA1 и PlexA4, в дендритных клетках используется главным образом PlexA1.

МАКРОФАГИ

В отношении макрофагов, так же как и в отношении дендритных клеток, семафорин 3А известен в основном как положительный регулятор. Зрелые макрофаги сами синтезируют этот белок, а также его рецепторы, благодаря чему являются не только источником семафорина 3А, но и его мишенями.

В моноцитах крови человека экспрессия мРНК семафорина 3А практически не выявляется [19, 22, 25], однако она начинает появляться при созревании клеток в присутствии М-CSF [25] и значительно усиливается при их последующей активации LPS [38]. Аналогичная картина наблюдается и у мышей — в неактивированных перитонеальных, селезеночных и костномозговых макрофагах выявляется лишь слабая экспрессия мРНК семафорина 3А, которая заметно усиливается при активации клеток с помощью LPS или других агонистов TLR [15].

Методами ОТ-ПЦР и проточной цитометрии показано, что моноциты крови человека не экспрессируют Nrp-1 [22, 25, 34] и слабо экспрессируют плексины А-класса [22, 25, 38]. Экспрессия мРНК этих рецепторов (кроме PlexA4) значительно усиливается при созревании макрофагов в присутствии М-CSF [25, 38]. При дальнейшей активации макрофагов человека в присутствии IFN- γ экспрессия мРНК Nrp-1 может снижаться, так же как и экспрессия мРНК PlexA1 в присутствии LPS [25].

Несколько иная картина отмечается у мышей. Экспрессия Nrp-1 отмечается уже на ранних костномозговых предшественниках моноцитов/макрофагов [60] и на моноцитах крови [61]. В этих же Nrp-1⁺ костномозговых предшественниках экспрессируется мРНК PlexA1 и PlexA3 [60]. При созревании костномозговых макрофагов в присутствии М-CSF в них можно обнаружить мРНК PlexA1, A2, A4 (но не A3) и Nrp-1 [18, 61].

В резидентных перитонеальных макрофагах выявляется мРНК рецепторов Nrp-1 [62] и PlexA4, а также их присутствие на мембране [15, 46]. С помощью проточной цитометрии

Nrp-1 обнаруживается на классически (M1) и альтернативно (M2) активированных макрофагах [63]. Экспрессия Nrp-1 и PlexA1 заметно усиливается в присутствии IFN- γ *in vitro* и после введения LPS *in vivo* в микроглию — резидентных макрофагах головного мозга новорождённых крыс [26]. Таким образом, у грызунов экспрессия рецепторов семафорина 3А выявляется не только на зрелых, но и на незрелых мононуклеарных фагоцитах, а при активации макрофагов экспрессия рецепторов усиливается.

Семафорин 3А является хемоаттрактантом для макрофагов — повышает их спонтанную миграцию по положительному градиенту концентрации. Это показано *in vitro* в отношении костномозговых предшественников моноцитов [60, 64], костномозговых [61] и перитонеальных макрофагов мышей [17], а также CD14⁺ макрофагов человека, выделенных из печени больных гепатоклеточной карциномой [65]. Усиление миграционной активности костномозговых макрофагов мышей под влиянием семафорина 3А наблюдали также на модели локального повреждения монослоя в тесте «царапина» [63].

Усиление хемотаксиса под действием семафорина 3А опосредуется участием рецептора Nrp-1 [17, 60, 61, 64], и этот эффект можно отменить добавлением Y-27632 — ингибитора ROCK-киназы [17]. Кроме того, в реализации стимулирующего действия семафорина 3А на миграцию макрофагов мышей участвуют PlexA1 и PlexA4, поскольку посттрансляционная инактивация их генов с помощью малых интерферирующих РНК (siRNA) отменяет эффект данного фактора [61].

Однако существует одна работа, противоречащая этим данным, в которой было показано, что семафорин 3А ингибирует спонтанную миграцию моноцитов крови человека *in vitro* [1]. Она была выполнена в 2001 г. и является первой работой по изучению миграции клеток иммунной системы в присутствии семафорина 3А. В ней был использован не рекомбинантный белок, а супернатант трансфицированных COS7-клеток, который мог содержать другие факторы, кроме семафорина 3А. На это указывают несколько фактов, в том числе и то, что эффект, приписываемый семафорину 3А, не был связан с Nrp-1 [1].

Способность семафорина 3А привлекать макрофаги мышей была также подтверждена *in vivo*. Это было показано путём подкожного введения Матригеля, содержащего семафорин 3А [61], или с помощью переноса гена

данного фактора в скелетную мышцу с последующим количественным учётом числа мононуклеаров на тканевых срезах [64]. В организме семафорин 3А может привлекать макрофаги в ткани с его повышенным содержанием, например, в опухоли [61] или патологически изменённую сетчатку глаза [17].

Таким образом, можно заключить, что сам семафорин 3А является для макрофагов хемоаттрактантом. Однако в комбинации с другими индукторами миграционной активности он может вести себя по-разному. Так, в присутствии хемокина CCL21 *in vitro* нейрональный фактор стимулирует миграцию костномозговых макрофагов мышей [61], а в сочетании с ростовым фактором M-CSF — подавляет [18]. Этот эффект реализуется через Nrp-1 и связан с подавлением RhoA-сигнального пути, активированного M-CSF.

Другой важный аспект влияния семафорина 3А на функционирование макрофагов — регуляция синтеза цитокинов. Если макрофаги не активированы, то нейрональный фактор не влияет на продукцию и синтез TNF- α и IL-6 *in vitro* [15], а также на экспрессию мРНК других цитокинов (IL-1 β , IL-12a, IL-10, TGF- β) и хемокинов [63]. Однако в случае активации макрофагов семафорин 3А оказывает действие на синтез цитокинов, причём разнонаправленное.

Так, при одновременном добавлении семафорина 3А и LPS был получен стимулирующий эффект семафорина 3А на синтез TNF- α и IL-6, усиливающий действие LPS [15]. Действие семафорина 3А было опосредовано рецептором PlexA4 и усиливало активацию малой ГТФазы Rac1. Семафорин 3А и LPS активировали Rac1 каждый в отдельности, а при их совместном добавлении происходила суммация эффектов. В этих экспериментах использовали субоптимальную дозу LPS (50 нг/мл).

В другой работе, где применяли полную активацию макрофагов мышей с помощью двух стимулов (LPS и INF- γ), добавление семафорина 3А на экспрессию мРНК TNF- α , IL-6 и IL-12a уже не влияло [63]. Это согласуется с данными об отсутствии влияния нейронального фактора на продукцию TNF- α в макрофагах человека, стимулированных с помощью 1 мкг/мл LPS [38].

Ещё в одной работе речь идёт уже об ингибирующем действии семафорина 3А. С использованием костномозговых макрофагов мышей показано, что добавление семафорина 3А вызывает подавление синтеза провоспалительных

цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α , индуцированного LPS/IFN- γ [66]. Существенное отличие данной работы заключается в том, что в ней была изменена последовательность внесения факторов — сначала макрофаги прединкубировали с семафоринами в течение 1 суток, а затем уже вносили LPS/IFN- γ [66].

Можно предположить, что при работе *in vitro* с комбинацией нескольких факторов, конкурирующих за общие сигнальные пути, важную роль играет последовательность внесения препаратов, и это во многом объясняет описанные выше разночтения при анализе модулирующего действия семафорина 3А. При этом существенна и концентрация вносимых препаратов, от которой зависит степень активации клеток, а также тканевой источник получения клеток и степень их зрелости. Для уточнения этого вопроса необходимо использовать разные варианты постановки эксперимента в одной работе. В настоящее время оценка влияния семафорина 3А на синтез провоспалительных цитокинов макрофагами *in vitro* крайне неоднозначна, и критерием её релевантности могут служить результаты, полученные *in vivo*.

Одной из ключевых работ по исследованию влияния семафорина 3А на макрофаги является работа Wen et al. [15], в которой было показано, что нейрональный фактор способен стимулировать синтез цитокинов также и в организме. Внутривенное введение семафорина 3А мышам с экспериментальным полимикробным перитонитом (частичная перевязка слепой кишки с последующим прокалыванием) вызывало повышение содержания провоспалительных цитокинов и хемокинов в перитонеальном лаваже, чего не наблюдалось у животных (PlexA4^{-/-}) с дефицитом рецептора. Эти же мыши были более резистентными к развитию сепсиса, вызываемого летальной дозой LPS, и у них выявляли значительно меньшие концентрации провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-12p70 в сыворотке крови [15].

В этой же работе был установлен неизвестный ранее факт участия PlexA4 в проведении сигнала от TLR. В макрофагах, полученных от мышей (PlexA4^{-/-}) с дефицитом рецептора, была снижена продукция провоспалительных цитокинов в ответ на стимуляцию агонистами TLR или бактериями [15]. При этом в макрофагах PlexA4^{-/-} происходило подавление активации Rac1, индуцированной TLR, с последующим снижением активации JNK (с-Jun N-terminal kinase) и NF- κ B (nuclear factor- κ B).

Тем самым было показано, что PlexA4 не только проводит сигнал от семафорина 3А, усиливающий ответ на LPS, но и по неизвестному механизму вовлечён в проведение сигнала от TLR вне связи с семафоринами.

Данные о том, что семафорин 3А может дополнительно активировать макрофаги при развитии бактериальной инфекции, позволили обосновать новый подход к лечению и предупреждению развития сепсиса у экспериментальных животных [15], который был использован в дальнейшем. Внутривенное введение моноклональных антител к семафорину 3А дозозависимо снижало летальность у мышей с сепсисом, который вызывали введением LPS [67]. Несколько неожиданным оказался результат, свидетельствующий о том, что уровень содержания TNF- α в сыворотке крови таких животных не снижался.

Таким образом, по имеющимся в литературе данным можно заключить, что сам семафорин 3А на синтез провоспалительных цитокинов макрофагами не влияет, но может модулировать действие других активаторов.

Поскольку синтез провоспалительных цитокинов является лишь частью активационного статуса макрофагов, исследовали также влияние семафорина 3А и на другие показатели. В настоящее время описано несколько вариантов активации макрофагов, среди которых выделяют М1 или классически активированные макрофаги (под действием LPS и IFN- γ) и М2 или альтернативно активированные (под влиянием IL-4, IL-13 или IL-10) [68]. М1-макрофаги характеризуются выраженной микробицидной и туморицидной активностью, М2 — способствуют ангиогенезу и репаративным процессам. Влияние семафорина 3А на поляризацию макрофагов исследовано в двух работах.

В работе Teng et al. [66] было показано, что прединкубация костномозговых макрофагов мышей с семафоринами 3А в течение 1 суток ингибирует образование М1-макрофагов, но положительно влияет на формирование М2-фенотипа макрофагов. При этом семафорин 3А снижает индуцированное LPS фосфорилирование STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), сигнальной молекулы, имеющей значение для поляризации М1-макрофагов.

В другой работе исследовали, как уже поляризованные М1- и М2-макрофаги, обработанные LPS/IFN- γ или IL-4/TGF- β соответственно, отвечают на семафорин 3А. Оказалось, что в этом случае добавление нейронального фактора

не влияет ни на экспрессию мРНК цитокинов и хемокинов в макрофагах мышей, ни на их миграцию *in vitro* [63]. Однако семафорин 3А существенным образом влияет на пролиферативную активность макрофагов — стимулирует, если они имеют фенотип М1, и подавляет — в случае М2-клеток. При этом семафорин 3А также усиливает индуцированное CSF1 фосфорилирование Akt и MAPK в М1-макрофагах и подавляет — в М2-клетках; данный эффект осуществляется через Nrp-1 [63].

Таким образом, в одной работе было показано, что семафорин 3А подавляет сигнальные пути, характерные для поляризации М1-макрофагов и способствует формированию М2-фенотипа [66], в другой — наоборот [63]. Дальнейшие исследования позволят внести большую ясность в этот вопрос.

Семафорин 3А не влияет на фагоцитоз опсонизированных эритроцитов макрофагами человека, но стимулирует в них развитие Fas-независимого апоптоза [25]. Нейрональный фактор также способен индуцировать апоптоз в культуре обогащённых клеток микроглии (резидентных макрофагов центральной нервной системы), полученных из мозга новорождённых крыс. Эффект отменяется при добавлении антител, блокирующих Nrp-1, и усиливается, если клетки микроглии активировать с помощью IFN- γ [26]. Также показано, что нейроны, находящиеся в состоянии стресса, синтезируют семафорин 3А, который вызывает апоптоз активированной микроглии. Авторы предполагают, что при травме нервной ткани данная реакция может подавлять избыточное воспаление, связанное с активацией макрофагов, и защищать нейроны от дополнительного повреждения.

Ещё одно важное направление изучения макрофагов — влияние семафорина 3А на дифференцировку остеокластов. Эти клетки также относятся к системе мононуклеарных фагоцитов. Они представляют собой макрофаги костной ткани, ответственные за резорбцию кости. Одним из основных факторов дифференцировки остеокластов является RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand), цитокин семейства факторов некроза опухоли, который взаимодействует с клетками через рецептор RANK.

Дифференцировку остеокластов изучали на модели костномозговых предшественников моноцитов/макрофагов, культивируемых в присутствии M-CSF и RANKL. Было показано, что добавление семафорина 3А подавляет

их дифференцировку *in vitro* [66], и этот эффект реализуется через Nrp-1 и PlexA1 [18]. При этом семафорин 3А подавляет дифференцировку остеокластов только в том случае, если его добавляют до внесения активирующего фактора RANKL, но не наоборот [18]. Было показано, что семафорин 3А и RANKL находятся в конкурентных взаимоотношениях за использование PlexA1 для проведения сигнала, поскольку для дифференцировки остеокластов при участии RANKL необходимо формирование комплекса PlexA1–TREM2–DAP12.

Если на мембране остеокластов присутствует Nrp-1, он конститутивно формирует комплекс с PlexA1, и при наличии семафорина 3А взаимодействует с ним. Добавление RANKL после этого оказывается неэффективным, а образование остеокластов нарушается. Если же сначала добавлять RANKL, то семафорин 3А не будет проявлять своё ингибирующее действие, поскольку RANKL обладает способностью подавлять экспрессию Nrp-1. В результате этого PlexA1 будет использован для образования комплекса PlexA1–TREM2–DAP12 и осуществится дифференцировка остеокластов [18].

Описанный механизм является примером того, как последовательность внесённых факторов влияет на результат экспериментов, в том случае, если эти факторы конкурируют между собой за общие рецепторы или сигнальные пути, и отчасти объясняет противоречивые результаты по изучению действия семафорина 3А *in vitro*.

Ингибирующее действие семафорина 3А на дифференцировку остеокластов было также продемонстрировано и в организме мышей. У животных с дефицитом как самого фактора (Sema 3a^{-/-}), так и с функциональным дефектом его рецептора (Nrp-1^{Sema-}) наблюдали увеличение количества остеокластов и выраженную остеопению костей [18]. Локальное введение семафорина 3А мышам с экспериментальной травмой ускоряло процесс восстановления кости, а внутривенное введение мышам с удалёнными яичниками (модель остеопороза после менопаузы) оказывало остеопротективный эффект. Это позволяет рассматривать семафорин 3А как перспективный препарат для лечения заболеваний костей [18] и суставов [66].

Таким образом, основные эффекты семафорина 3А в отношении макрофагов — это стимуляция миграции, модуляция синтеза цитокинов, а также влияние на поляризацию и дифференцировку этих клеток.

ОТКРЫТИЕ ХЕМОРЕПЕЛЛЕНЦИИ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ И ЕГО ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ИММУНОЛОГИИ

Хемотаксис — направленная миграция клеток по градиенту химического вещества — является одним из фундаментальных процессов живых организмов. В настоящее время хемотаксис считается двунаправленным процессом и может происходить как в сторону повышения градиента химического вещества (хемоттакция), так и в противоположную сторону (хемореппелляция), что регулируется балансом хемотактантов и хемореппеллентов в клеточном микроокружении [69].

Однако в течение длительного времени хемотаксис клеток иммунной системы рассматривали только с позиций хемоттакции. Несмотря на то что ещё в ранних работах (1939 г.) было описано хемореппеллентное действие силиката алюминия на лейкоциты человека и кролика [70], этот эффект практически не изучался.

Открытие хемореппелляции в конце 1990-х гг. в нервной системе, где семафорин-3-класса и некоторые другие нейрональные факторы оказывают отталкивающее действие на конус роста аксона, отклоняя его от прорастания в не предусмотренные для этого области [71], послужило стимулом для исследований хемореппелляции клеток иммунной системы уже на новом уровне.

Первыми иммунологическими факторами, для которых был показан хемореппеллентный эффект, оказались два известных хемокина — SDF-1/CXCL12 и IL-8. В повышенных концентрациях SDF-1 проявлял свою активность не как хемотактант, а как хемореппеллент в отношении Т-лимфоцитов [72], в то время как IL-8 оказывал аналогичный эффект в отношении своих клеток-мишеней — нейтрофилов человека [73]. Появилось новое представление о направленной миграции клеток иммунной системы от химического вещества, для обозначения которого был предложен специальный термин — «фугетаксис» (от греческого *fugere* — избегать и *taxis* — движение), который, однако, не получил большого распространения [74].

Хемореппеллентный эффект самого семафорина 3А был также продемонстрирован не только в нервной, но и в иммунной системе. Впервые это было показано на тимоцитах человека [54], затем — на тимоцитах мыши [55] и дендритных клетках [16].

Явление хемореппелляции в иммунной системе играет важную роль как в норме, так и при патологии. Предполагают, что сортировка клеток на входе в различные органы может иметь значение для создания иммунологически привилегированных зон в организме; хемореппелленты могут регулировать выход Т-лимфоцитов из лимфоузлов и тимуса, а также их предшественников из костного мозга [74].

Имеются сведения об участии семафорин-3-класса, синтезируемых стромой тимуса, в процессе сортировки лимфоидных предшественников на входе в этот орган у мышей во время эмбрионального и раннего постнатального развития [75].

Изучался вопрос об участии семафорина 3А, как хемореппеллента, в эмиграции тимоцитов на периферию при росте перевиваемой опухоли [55]. Однако данных, подтверждающих это предположение, получено не было, поскольку ни экспрессия самого фактора, ни экспрессия его рецепторов в тимусе при росте гепатомы 22а не изменялись, так же как и трансэндотелиальная миграция тимоцитов в присутствии семафорина 3А.

Семафорин 3А, синтезируемый во многих опухолях, может оказывать выраженное негативное действие как хемореппеллент. Он способен усиливать выход малигнизированных клеток из опухолевого узла и повышать риск метастазирования [65]. Кроме того, семафорин 3А блокирует миграцию цитотоксических Т-лимфоцитов в опухоль, чем способствует её ускользанию от иммунного надзора [21].

Изучение хемореппелляции не только существенным образом обогащает наши представления о процессах миграции клеток в организме, но имеет и практическое значение. Хемореппелленты различного происхождения можно использовать для лечения воспалительных заболеваний с целью предотвращения избыточной миграции лейкоцитов в ткани [76], а также для подавления иммунологической атаки после трансплантации органов [74].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В начале 2000 гг. в научной литературе сформировалось представление об «иммунных семафоринах», как о группе нейрональных факторов с иммунорегуляторными свойствами [77]. Основное внимание было уделено семафоринам 4- и 7-классов, а семафорину 3А отводилось в этой категории очень скромное место. Его

рассматривали только как фактор, регулирующий миграцию лейкоцитов [1].

В 2012 г. появилась более полная характеристика семафорина 3А, которая является общепринятой и в настоящее время [3, 4, 7]. Семафорин 3А был представлен как фактор, осуществляющий двунаправленную регуляцию иммунного ответа — подавление функций Т-лимфоцитов и стимуляцию врождённого иммунитета [78]. В этой же публикации был приведён анализ первых сообщений о применении нейронального фактора для терапии иммуноопосредованных заболеваний в эксперименте и сформулировано новое представление о семафоре 3А, как о перспективном терапевтическом средстве для их лечения.

За последующие 10 лет изучение семафорина 3А происходило именно в этом направлении. В многочисленных экспериментальных работах нейрональный фактор, обладающий иммунорегуляторными и анти-ангиогенными свойствами, стали рассматривать как средство от многих болезней человека, включающих аллергические, аутоиммунные и онкологические заболевания [2–4]. При этом не было получено существенно новых данных о роли семафорина 3А в регуляции иммунного ответа при отсутствии патологии, единая концепция его влияния на иммунологические процессы не была сформирована, и наши знания об этом и сегодня имеют фрагментарный характер. В настоящем обзоре мы впервые попытались объединить все имеющиеся сведения по иммунорегуляторному действию семафорина 3А, полученные за последние 20 лет, и обсудить их с разных точек зрения.

Если рассматривать основные механизмы действия семафорина 3А на клетки иммунной системы, то основной точкой приложения является перестройка актинового цитоскелета и связанная с ней регуляция процессов миграции, адгезии и межклеточной кооперации.

Другим важным звеном иммунорегуляторного действия семафорина 3А является способность Nrp-1 и плексинов участвовать в проведении сигналов от неродственных семафорину факторов. Тем самым семафорин 3А может оказывать модулирующее действие в отношении различных клеточных активаторов, включающих ростовые факторы, хемокины или бактериальные продукты.

В одних случаях между семафорин 3А и другими факторами возникают антагонистические взаимодействия. Так, например, семафорин 3А подавляет миграцию тимоцитов,

индуцированную SDF-1 [56] и миграцию макрофагов, индуцированную M-CSF [18], ингибирует пролиферацию клеток эпителия тимуса, активированную ростовыми факторами KGF и HGF [58], а также оказывает негативное влияние на дифференцировку остеокластов в присутствии RANKL [18]. В других случаях могут возникать синергические взаимодействия — семафорин 3А усиливает синтез провоспалительных цитокинов, индуцированных LPS, в макрофагах мышей [15].

Если проанализировать, на какие функции клеток иммунной системы влияет семафорин 3А, то основным действием этого фактора остаётся контроль миграции. Семафорин 3А регулирует миграцию всех рассматриваемых клеток, включая Т-лимфоциты [21, 23, 41], дендритные клетки [16, 22] и макрофаги [17, 60, 61, 63–65]. При этом, как и в нервной системе, это может происходить в виде хемоаттракции (для макрофагов) или в виде хемореппелленции (для дендритных клеток). Предполагается, что выбор направления движения по положительному или отрицательному градиенту определяется поляризацией клетки, асимметричным расположением рецепторов и адгезионных молекул, а также концентрацией вторичных мессенджеров — Ca^{2+} и циклических нуклеотидов [69, 79].

Кроме миграции, семафорин 3А влияет также на адгезию и межклеточную кооперацию в иммунной системе. Он подавляет адгезию тимоцитов [80] и CD8^+ Т-лимфоцитов мышей [21] к субстрату, формирование контактов между тимоцитами и эпителиальными клетками тимуса [54], а также между Т-лимфоцитами и дендритными клетками [20]. Кроме того, семафорин 3А проявляет ингибирующую активность при взаимодействии Т-лимфоцитов с опухолевыми клетками, которая выражается в подавлении адгезии [13] и цитотоксической активности Т-лимфоцитов [41].

Из других функций следует отметить негативное влияние семафорина 3А на пролиферативную активность Т-лимфоцитов [13, 19, 38] и тимоцитов [57], а также усиление апоптоза в Т-клеточных линиях [24] и макрофагах человека [25].

Немаловажный вопрос — где и при каких условиях в организме проявляется действие семафорина 3А. Этот фактор конститутивно экспрессируется в органах иммунной системы (тимусе, селезёнке, лимфатических узлах) [18, 54, 55], что предполагает его важную гомеостатическую роль. Концентрация семафорина 3А в сыворотке крови здоровых людей колеблется в

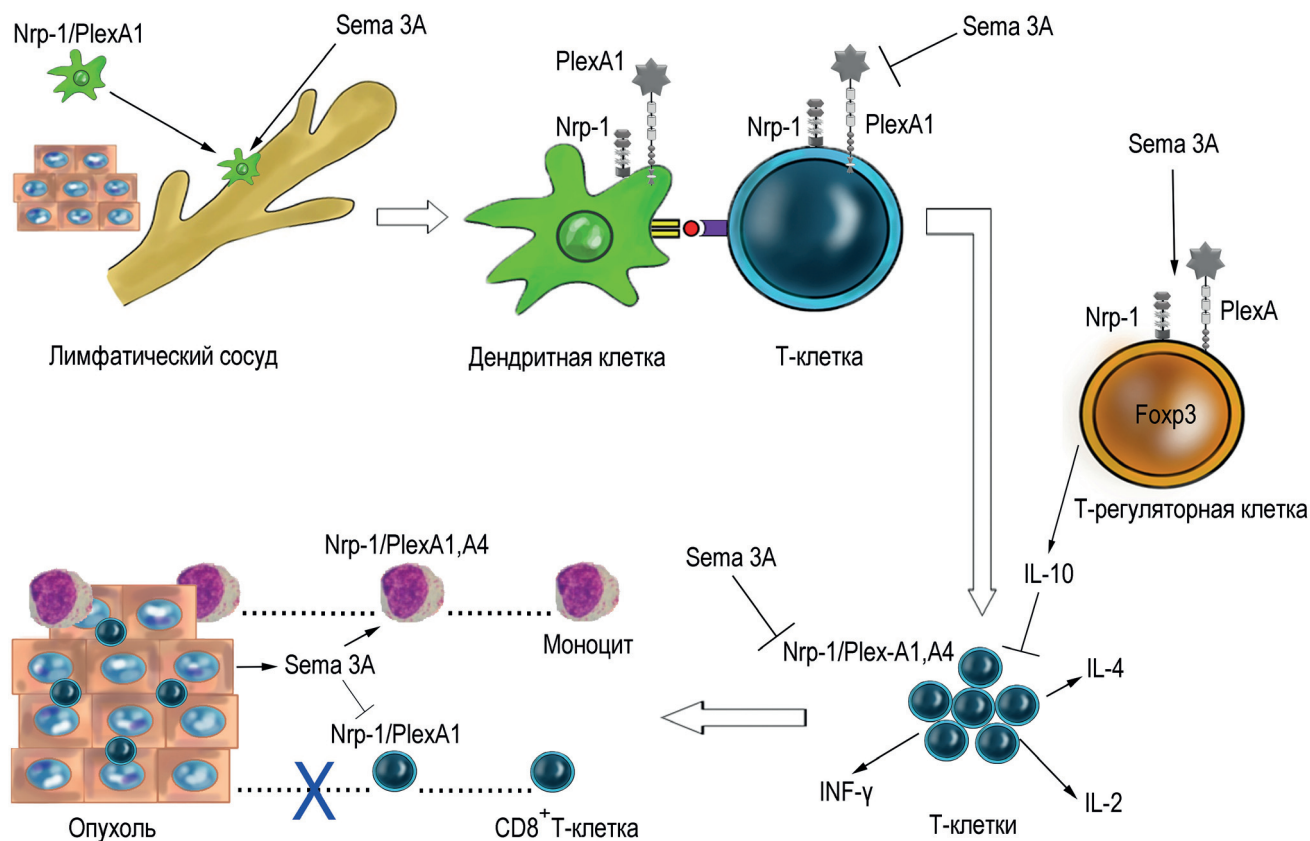


Рис. 3. Гипотетическая схема основных точек приложения действия семафорина 3A (Sema 3A) в иммунной системе (пояснения в тексте)

широких пределах (от 10 до 90 нг/мл и более) [2]. Приблизительно такие же концентрации (50–100 нг/мл) большинство авторов использует для изучения действия семафорина 3A *in vitro*. Из этого следует, что концентрация семафорина 3A в циркуляции достаточна для проявления его биологической активности. Однако находящиеся в периферической крови Т-лимфоциты и моноциты не имеют рецепторов семафорина 3A и, следовательно, не подвергаются его действию. Рецепторы появляются при активации клеток, и тогда они приобретают способность отвечать на семафорин 3A [25, 38, 40].

Кроме того, рецепторы семафорина 3A обнаруживаются на клетках иммунной системы, находящихся в тканях — на тканевых макрофагах и небольшой части Т-лимфоцитов. По-видимому, при отсутствии патологии этот фактор главным образом регулирует внутритканевую миграцию клеток, а также выход клеток из тканей в лимфоток, как это показано для дендритных клеток [16].

Роль семафорина 3A как внутритканевого клеточного регулятора лучше всего изучена в

тимусе. Этот фактор конститутивно синтезируется эпителиальными клетками тимуса, а мишенями для действия семафорина 3A являются сами эпителиальные клетки и тимоциты [54, 55, 57–59]. Он регулирует миграцию тимоцитов, процесс адгезии/деадгезии тимоцитов и эпителиальных клеток, а также пролиферацию тимоцитов и эпителиальных клеток.

В условиях патологии локальные концентрации семафорина 3A в тканях могут существенно меняться. В таких случаях семафорин 3A, наряду с хемокинами и ростовыми факторами, может контролировать клеточный состав воспалительного инфильтрата, привлекая одни клетки и блокируя миграцию других. Например, при повышении содержания семафорина 3A в опухолях наблюдается усиленный приток туда макрофагов [60, 61, 63, 65] и подавление миграции CD8⁺ Т-лимфоцитов [21, 41].

Действие семафорина 3A, систематизированное по фазам иммунного ответа, представлено на рис. 3.

На этапе инициации иммунного ответа семафорин 3A действует как положительный

фактор, поскольку способствует выходу дендритных клеток из периферических тканей в лимфоток для их дальнейшей миграции в регионарные лимфатические узлы и презентации антигена Т-лимфоцитам [16].

На всех последующих этапах, связанных с участием Т-лимфоцитов, семафорин 3А оказывает негативный эффект: подавляет активацию Т-лимфоцитов и передачу сигнала от TCR во время презентации антигена [19, 20], ингибирует пролиферацию эффекторных CD4⁺ Т-лимфоцитов и синтез цитокинов [38, 46], активирует Т-регуляторные клетки, которые, в свою очередь, оказывают супрессорное действие [38, 39]. Предполагают, что эффект семафорина 3А вызывает терминацию процесса или предотвращение гиперактивации Т-лимфоцитов [19], однако конкретная роль этого фактора не установлена.

В ряде случаев при развитии патологии иммуносупрессорное действие семафорина 3А рассматривают как положительный фактор и предлагают использовать его экзогенное введение для лечения аутоиммунных и аллергических заболеваний в эксперименте [2, 4]. В то же время при росте опухолей, продуцирующих этот фактор (рис. 3), его ингибирующее действие может играть негативную роль — подавлять противоопухолевый иммунитет, вызывая ингибицию миграции, адгезии и цитотоксической активности CD8⁺ Т-лимфоцитов [13, 21, 41]. В этом случае применяют противоположную тактику и разрабатывают способы блокирования семафорина 3А и его рецепторов в организме [21, 41]. Клинические запросы обуславливают необходимость проведения дальнейших исследований для определения значимости вклада семафорина 3А в регуляцию Т-клеточного иммунного ответа.

Остаётся нерешённым вопрос о биологической роли рецепторов семафорина 3А (Ngr-1 и PlexA1) в иммунном синапсе, которые являются его компонентами как со стороны Т-лимфоцитов, так и дендритных клеток [14, 19, 20, 34, 35]. Если для Т-лимфоцитов взаимодействие этих рецепторов с семафоринном 3А и его негативный эффект показаны, то лиганды, с которыми взаимодействуют эти рецепторы на дендритных клетках, ещё не определены. Необходимость присутствия этих рецепторов на дендритных клетках для проявления их способности активировать Т-лимфоциты, возможно, и не связана с семафоринном 3А, что, однако, требует экспериментального подтверждения.

В настоящий момент предположение о том, что при взаимодействии двух клеток друг с другом некий фактор одну из них мог бы подавлять, а другую — стимулировать, представляется весьма сомнительным.

Отличительной особенностью семафорина 3А является его способность, параллельно с ингибацией Т-клеточного звена иммунитета, оказывать стимулирующее действие на клетки мононуклеарно-фагоцитарной системы. Этот фактор, прежде всего, является хемоаттрактантом для моноцитов и макрофагов, что показано у мышей *in vivo* и *in vitro* [17, 60, 61, 63]. Однако мы не можем прямо переносить эти экспериментальные данные на организм человека, поскольку в экспрессии рецепторов семафорина 3А существуют межвидовые различия. У человека, в отличие от мышей [60, 61], рецепторы семафорина 3А на моноцитах крови практически отсутствуют [22, 25, 34, 38], что указывает на потенциальную возможность взаимодействия данного фактора только с активированными моноцитами.

Семафорин 3А не является стимулятором таких функций макрофагов, как продукция провоспалительных цитокинов и хемокинов [15, 38, 63], но может модулировать ответ макрофагов на другие активирующие стимулы (например, на LPS и IFN- γ) [15, 63, 66]. Однако результаты этих работ противоречат друг другу и не позволяют однозначно охарактеризовать семафорин 3А как провоспалительный или как противовоспалительный фактор. Кроме того, в настоящее время не представляется возможным дать утвердительный ответ на вопрос, способствует ли семафорин 3А поляризации макрофагов в направлении M1- [66] или M2-фенотипа [63].

Между тем ответы на нерешённые вопросы по влиянию семафорина 3А на макрофаги важны для оценки роли этого фактора в патогенезе таких заболеваний, как ревматоидный артрит [66], сепсис [15] и опухолевый рост [60, 63], поскольку определяют стратегию применения семафорина 3А в качестве лечебного средства. Пока здесь нет единого мнения: одни авторы предлагают вводить семафорин 3А в организм как противовоспалительный фактор, как, например, при ревматоидном артрите [66], другие считают, что с этой же целью нужно нейтрализовать действие семафорина 3А, как это показано при экспериментальном сепсисе [15, 67].

В настоящее время не вызывает сомнения, что семафорин 3А играет важную иммуно-

регуляторную роль в организме в нормальных и патологических условиях, что позволяет рассматривать этот фактор и его рецепторы как перспективные мишени для терапевтического воздействия. Дальнейшие исследования прольют свет на нерешённые вопросы и позволят обосновать новые подходы для лечения многих заболеваний человека.

Финансирование. Работа выполнена в рамках плановой темы НИР ФГБНУ «ИЭМ» FGWG-2022-0005 (рег. № 122020300186-5).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Delaire, S., Billard, C., Tordjman, R., Chedotal, A., Elhabazi, A., et al. (2001) Biological activity of soluble CD100. II. Soluble CD100, similarly to H-SemaIII, inhibits immune cell migration, *J. Immunol.*, **166**, 4348-4354.
2. Vadasz, Z., and Toubi, E. (2018) Semaphorin3A: A potential therapeutic tool in immune-mediated diseases, *Eur. J. Rheumatol.*, **5**, 58-61.
3. Toledano, S., Nir-Zvi, I., Engelman, R., Kessler, O., and Neufeld, G. (2019) Class-3 semphorins and their receptors: potent multifunctional modulators of tumor progression, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 556, doi: 10.3390/ijms20030556.
4. Kalmarzi, R. N., Rajabinejad, M., and Lotfi, R. (2020) Immune semaphorins: Crucial regulatory signals and novel therapeutic targets in asthma and allergic diseases, *Eur. J. Pharmacol.*, **881**, 173209, doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173209.
5. Alto, L. T., and Terman, J. R. (2017) Semaphorins and their signaling mechanisms, *Methods Mol. Biol.*, **1493**, 1-25, doi: 10.1007/978-1-4939-6448-2_1.
6. Chapoval, S. P. (2018) Neuroimmune semaphorins as costimulatory molecules and beyond, *Mol. Med.*, **24**, 13, doi: 10.1186/s10020-018-0014-9.
7. Nakanishi, Y., Kang, S., and Kumanogoh, A. (2021) Neural guidance factors as hubs of immunometabolic cross-talk, *Int. Immunol.*, **33**, 749-754, doi: 10.1093/intimm/dxab035.
8. Chuckran, C. A., Liu, C., Bruno, T. C., Workman, C. J., and Vignali, D. A. A. (2020) Neuropilin-1: A checkpoint target with unique implications for cancer immunology and immunotherapy, *J. Immunother. Cancer*, **8**, e000967, doi: 10.1136/jitc-2020-000967.
9. Niland, S., and Eble, J. A. (2020) Neuropilin: Handyman and power broker in the tumor microenvironment, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1223**, 31-67.
10. Raper, J. A., and Kapfhammer, J. P. (1990) The enrichment of a neuronal growth cone collapsing activity from embryonic chick brain, *Neuron*, **4**, 21-29.
11. Janssen, B. J., Malinauskas, T., Weir, G. A., Cader, M. Z., Siebold, C., et al. (2012) Neuropilins lock secreted semaphorins onto plexins in a ternary signaling complex, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 1293-1299, doi: 10.1038/nsmb.2416.
12. Valdembrì, D., Regano, D., Maione, F., Giraudo, E., and Serini, G. (2016) Class 3 semaphorins in cardiovascular development, *Cell Adhes. Migr.*, **10**, 641-651.
13. Catalano, A., Caprari, P., Moretti, S., Faronato, M., Tamagnone, L., et al. (2006) Semaphorin-3A is expressed by tumor cells and alters T-cell signal transduction and function, *Blood*, **107**, 3321-3329.
14. Eun, S.-Y., O'Connor, B. P., Wong, A. W., van Deventer, H. W., Taxman, D. J., et al. (2006) Cutting edge: Rho activation and actin polarization are dependent on Plexin-A1 in dendritic cells, *J. Immunol.*, **177**, 4271-4275.
15. Wen, H., Lei, Y., Eun, S.-Y., and Ting, J. P. (2010) Plexin-A4-semaphorin 3A signaling is required for Toll-like receptor and sepsis-induced cytokine storm, *J. Exp. Med.*, **207**, 2943-2957.
16. Takamatsu, H., Takegahara, N., Nakagawa, Y., Tomura, M., Taniguchi, M., et al. (2010) Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II, *Nat. Immunol.*, **11**, 594-600.
17. Dejda, A., Mawambo, G., Cerani, A., Miloudi, K., Shao, Z., et al. (2014) Neuropilin-1 mediates myeloid cell chemoattraction and influences retinal neuroimmune crosstalk, *J. Clin. Invest.*, **124**, 4807-4822, doi: 10.1172/JCI76492.
18. Hayashi, M., Nakashima, T., Taniguchi, M., Kodama, T., Kumanogoh, A., et al. (2012) Osteoprotection by semaphorin 3A, *Nature*, **485**, 69-74.
19. Lepelletier, Y., Moura, I. C., Hadj-Slimane, R., Renand, A., Fiorentino, S., et al. (2006) Immunosuppressive role of semaphorin-3A on T cell proliferation is mediated by inhibition of actin cytoskeleton reorganization, *Eur. J. Immunol.*, **36**, 1782-1793.
20. Tran-Van, H., Avota, E., Bortlein, C., Mueller, N., and Schneider-Schaulies, S. (2011) Measles virus modulates dendritic cell/T-cell communication at the level of plexinA1/neuropilin-1 recruitment and activity, *Eur. J. Immunol.*, **41**, 151-163, doi: 10.1002/eji.201040847.
21. Barnkob, M., Michaels, Y. S., André, V., Macklin, P. S., Gileadi, U., et al. (2019) Semaphorin 3A induces cytoskeletal paralysis in tumor-specific CD8⁺ T cells, *BioRxiv*, doi: 10/1101/849083.

22. Curreli, S., Wong, B. S., Latinovic, O., Konstantopoulos, K., and Stamatou, N. M. (2016) Class 3 semaphorins induce F-actin reorganization in human dendritic cells: role in cell migration, *J. Leukoc. Biol.*, **100**, 1323-1334.
23. Vincent, P., Collette, Y., Marignier, R., Vuillat, C., Rogemond, V., et al. (2005) A role for the neuronal protein collapsin response mediator protein 2 in T lymphocyte polarization and migration, *J. Immunol.*, **175**, 7650-7660.
24. Moretti, S., Procopio, A., Lazzarini, R., Rippo, M. R., Testa, R., et al. (2008) Semaphorin3A signaling controls Fas (CD95)-mediated apoptosis by promoting Fas translocation into lipid rafts, *Blood*, **111**, 2290-2299.
25. Ji, J. D., Park-Min, K. H., and Ivashkiv, L. B. (2009) Expression and function of semaphorin 3A and its receptors in human monocyte-derived macrophages, *Hum. Immunol.*, **70**, 211-217.
26. Majed, H. H., Chandran, S., Niclou, S. P., Nicholas, R. S., Wilkins, A., et al. (2006) A novel role for Semaphorin 3A in neuroprotection from injury mediated by activated microglia, *J. Neurosci.*, **26**, 1730-1738, doi: 10.1523/jneurosci.0702-05.2006.
27. Battin, C., Linhares, A. D. S., Paster, W., Isenman, D. E., Wahrman, M., et al. (2019) Neuropilin-1 acts as a receptor for complement split products, *Front. Immunol.*, **10**, 2209, doi: 10.3389/fimmu.2019.02209.
28. Daly, J. L., Simonetti, B., Klein, K., Chen, K. E., Williamson, M. K., et al. (2020) Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection, *Science*, **370**, 861-865, doi: 10.1126/science.abd3072.
29. Takegahara, N., Takamatsu, H., Toyofuku, T., Tsujimura, T., Okuno, T., et al. (2006) Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis, *Nat. Cell Biol.*, **8**, 615-622, doi: 10.1038/ncb1416.
30. Fujisawa, H., Ohta, K., Kameyama, T., and Murakami, Y. (1997) Function of a cell adhesion molecule, plexin, in neuron network formation, *Dev. Neurosci.*, **9**, 101-105.
31. Takagi, S., Kasuya, Y., Shimizu, M., Matsuura, T., Tsuboi, M., et al. (1995) Expression of a cell adhesion molecule, neuropilin, in the developing chick nervous system, *Dev. Biol.*, **170**, 207-222.
32. Valdembr, D., Caswell, P. T., Anderson, K. I., Schwarz, J. P., Konig, I., et al. (2009) Neuropilin-1/GIPC1 signaling regulates $\alpha 5 \beta 1$ integrin traffic and function in endothelial cells, *PLoS Biol.*, **7**, e1000025.
33. Rutto, K. V., Kudryavtsev, I. V., and Kisseleva, E. P. (2018) Adhesion of thymocytes to the thymic epithelial cells and participation of neuropilin-1 and plexin A1 in the adhesion, *Cell Tissue Biol.*, **12**, 373-381, doi: 10.1134/S1990519X18050073.
34. Tordjman, R., Lepelletier, Y., Lemarchandel, V., Cambot, M., Gaulard, P., et al. (2002) A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response, *Nat. Immunol.*, **3**, 477-482.
35. Sarris, M., Andersen, K. G., Randow, F., Mayr, L., and Betz, A. G. (2008) Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition, *Immunity*, **28**, 402-413.
36. Delgoffe, G. M., Woo, S.-R., Turnis, M. E., Gravano, D. M., Guy, C., et al. (2013) Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis, *Nature*, **501**, 252-256, doi: 10.1038/nature12428.
37. Glinka, Y., and Prud'homme, G. J. (2008) Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor β -1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity, *J. Leukoc. Biol.*, **84**, 302-310.
38. Catalano, A. (2010) The neuroimmune semaphorin-3A reduces inflammation and progression of experimental autoimmune arthritis, *J. Immunol.*, **185**, 6373-6383, doi: 10.4049/jimmunol.0903527.
39. Cozacov, R., Halasz, K., Haj, T., and Vadasz, Z. (2017) Semaphorin 3A: Is a key player in the pathogenesis of asthma, *Clin. Immunol.*, **184**, 70-72, doi: 10.1016/j.clim.2017.05.011.
40. Milpied, P., Renand, A., Bruneau, J., Mendes-da-Cruz, D. A., Jacquelin, S., et al. (2009) Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3⁺ Treg, *Eur. J. Immunol.*, **39**, 1466-1471.
41. Leclerc, M., Voilin, E., Gros, G., Cognac, S., de Montpréville, V., et al. (2019) Regulation of antitumour CD8 T-cell immunity and checkpoint blockade immunotherapy by Neuropilin-1, *Nat. Commun.*, **10**, 3345, doi: 10.1038/s41467-019-11280-z.
42. Chaudhary, B., and Elkord, E. (2015) Novel expression of Neuropilin 1 on human tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer liver metastases, *Expert Opin. Ther. Targets*, **19**, 147-161.
43. Takagawa, S., Nakamura, F., Kumagai, K., Nagashima, Y., Goshima, Y., et al. (2013) Decreased Semaphorin3A expression correlates with disease activity and histological features of rheumatoid arthritis, *BMC Musculoskelet. Disord.*, **14**, 40, doi: 10.1186/1471-2474-14-40.
44. Corbel, C., Lemarchandel, V., Thomas-Vaslin, V., Pelus, A. S., Agboton, C., et al. (2007) Neuropilin 1 and CD25 co-regulation during early murine thymic differentiation, *Dev. Comp. Immunol.*, **31**, 1082-1094.
45. Wong, A. W., Brickey, W. J., Taxman, D. J., van Deventer, H. W., Reed, W., et al. (2003) CITA-regulated plexin-A1 affects T-cell-dendritic cell interactions, *Nat. Immunol.*, **4**, 891-898.
46. Yamamoto, M., Suzuki, K., Okuno, T., Ogata, T., Takegahara, N., et al. (2008) Plexin-A4 negatively regulates T lymphocyte responses, *Int. Immunol.*, **20**, 413-420.
47. Battaglia, A., Buzzonetti, A., Monego, G., Peri, L., Ferrandina, G., et al. (2008) Neuropilin-1 expression identifies a subset of regulatory T cells in human lymph nodes that is modulated by preoperative chemoradiation therapy in cervical cancer, *Immunology*, **123**, 129-138.

48. Jung, K., Kim, J.-A., Kim, Y.-J., Lee, H. W., Kim, C.-H., et al. (2020) A Neuropilin-1 antagonist exerts antitumor immunity by inhibiting the suppressive function of intratumoral regulatory T cells, *Cancer Immunol. Res.*, **8**, 46-56.
49. E, X. Q., Meng, H. X., Cao, Y., Zhang, S. Q., Bi, Z. G., et al. (2012) Distribution of regulatory T cells and interaction with dendritic cells in the synovium of rheumatoid arthritis, *Scand. J. Rheumatol.*, **41**, 413-420, doi: 10.3109/03009742.2012.696135.
50. Smyth, L. J., Starkey, C., Vestbo, J., and Singh, D. (2007) CD4-regulatory cells in COPD patients, *Chest*, **132**, 156-163, doi: 10.1378/chest.07-0083.
51. Bruder, D., Probst-Kepper, M., Westendorf, A. M., Geffers, R., Beissert, S., et al. (2004) Neuropilin-1: A surface marker of regulatory T cells, *Eur. J. Immunol.*, **34**, 623-630.
52. Weiss, J. M., Bilate, A. M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M. A., et al. (2012) Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3⁺ T reg cells, *J. Exp. Med.*, **209**, 1723-1742.
53. Solomon, B. D., Mueller, C., Chae, W. J., Alabanza, L. M., and Bynoe, M. S. (2011) Neuropilin-1 attenuates autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 2040-2045, doi: 10.1073/pnas.1008721108.
54. Lepelletier, Y., Smaniotto, S., Hadj-Slimane, R., Villa-Verde, D. M., Nogueira, A. C., et al. (2007) Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5545-5550.
55. Киселева Е. П., Лямина И. В., Цвиркун С. А., Рутто К. В., Кудрявцев И. В., и др. (2013) Изучение роли семафорина 3А в тимусе в норме и при опухолевом росте, *Мед. академ. журн.*, **13**, 42-48.
56. Garcia, F., Lepelletier, Y., Smaniotto, S., Hadj-Slimane, R., Dardenne, M., et al. (2012) Inhibitory effect of semaphorin-3A, a known axon guidance molecule in the human thymocyte migration induced by CXCL12, *J. Leukoc. Biol.*, **91**, 7-13.
57. Rutto, K. V., Lyudyno, V. I., Kudryavtsev, I. V., and Kiseleva, E. P. (2020) Semaphorin-3A inhibits proliferation, but does not affect apoptosis of mouse thymocytes *in vitro*, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **168**, 352-355, doi: 10.1007/s10517-020-04707-x.
58. Rutto, K. V., Ovsyukov, K. S., Kudryavtsev, I. V., and Kiseleva, E. P. (2019) Semaphorin 3A negatively affects proliferation of mouse thymus epithelial cell *in vitro*, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **166**, 339-343, doi: 10.1007/s10517-019-04346-x.
59. Mendes-da-Cruz, D. A., Lepelletier, Y., Brignier, A. C., Smaniotto, S., et al. (2009) Neuropilins, semaphorins, and their role in thymocyte development, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1153**, 20-28.
60. Carrer, A., Moimas, S., Zacchigna, S., Pattarini, L., Zentilin, L., et al. (2012) Neuropilin-1 identifies a subset of bone marrow Gr1 monocytes that can induce tumor vessel normalization and inhibit tumor growth, *Cancer Res.*, **72**, 6371-6381, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0762.
61. Casazza, A., Laoui, D., Wenes, M., Rizzolio, S., Bassani, N., et al. (2013) Impeding macrophage entry into hypoxic tumor areas by Sem3A/Nrp1 signaling blockade inhibits angiogenesis and restores antitumor immunity, *Cancer Cell*, **24**, 695-709.
62. Stepanova, O. I., Krylov, A. V., Lioudyno, V. I., and Kisseleva, E. P. (2007) Gene expression for VEGF-A, VEGF-C, and their receptors in murine lymphocytes and macrophages, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1194-1198.
63. Wallerius, M., Wallmann, T., Bartish, M., Ostling, J., Mezheyski, A., et al. (2016) Guidance molecule SEMA3A restricts tumor growth by differentially regulating the proliferation of tumor-associated macrophages, *Cancer Res.*, **76**, 3166-3178.
64. Zacchigna, S., Pattarini, L., Zentilin, L., Moimas, S., Carrer, A., et al. (2008) Bone marrow cells recruited through the neuropilin-1 receptor promote arterial formation at the sites of adult neoangiogenesis in mice, *J. Clin. Invest.*, **118**, 2062-2075, doi: 10.1172/JCI32832.
65. Hu, Z.-Q., Zhou, S.-L., Zhou, Z.-J., Luo, C.-B., Chen, E.-B., et al. (2016) Overexpression of semaphorin 3A promotes tumor progression and predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma after curative resection, *Oncotarget*, **7**, 51733-51746.
66. Teng, Y., Yin, Z., Li, J., Li, K., Li, X., and Zhang, Y. (2017) Adenovirus-mediated delivery of Sem3A alleviates rheumatoid arthritis in a serum-transfer induced mouse model, *Oncotarget*, **8**, 66270-66280.
67. Yamashita, N., Jitsuki-Takahashi, A., Ogawara, M., Ohkubo, W., Araki, T., et al. (2015) Anti-Semaphorin 3A neutralization monoclonal antibody prevents sepsis development in lipopolysaccharide-treated mice, *Int. Immunol.*, **27**, 459-466, doi: 10.1093/intimm/dxv014.
68. Martinez, F. O., and Gordon, S. (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment, *Fl1000Prime Rep.*, **6**, 13, doi: 10.12703/P6-13.
69. Huttenlocher, A., and Poznansky, M. C. (2008) Reverse leukocyte migration can be attractive or repulsive, *Trends Cell Biol.*, **18**, 298-306, doi: 10.1016/j.tcb.2008.04.001.
70. McCutcheon, M., Coman, D. R., and Dixon, H. M. (1939) Negative chemotropism in leukocytes, *Arch. Pathol.*, **17**, 61-68.
71. Polleux, F., Giger, R. J., Ginty, D. D., Kolodkin, A. L., and Ghosh, A. (1998) Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions, *Science*, **282**, 1904-1906.
72. Poznansky, M. C., Olszak, I. T., Foxall, R., Evans, R. H., Luster, A. D., et al. (2000) Active movement of T cells away from a chemokine, *Nat. Med.*, **6**, 543-548.
73. Tharp, W. G., Yadav, R., Irimia, D., Upadhyaya, A., Samadani, A., et al. (2006) Neutrophil chemorepulsion in defined interleukin-8 gradients

- in vitro* and *in vivo*, *J. Leukoc. Biol.*, **79**, 539-554, doi: 10.1189/jlb.0905516.
74. Vianello, F., Olszak, I. T., and Poznansky, M. C. (2005) Fugetaxis: Active movement of leukocytes away from chemokine gradient, *J. Mol. Med.*, **83**, 752-763.
 75. Takahashi, K., Ishida, M., Hirokawa, K., and Takahashi, H. (2008) Expression of the semaphorins Sema 3D and Sema 3F in the developing parathyroid and thymus, *Dev. Dyn.*, **237**, 1699-1708.
 76. Herlihy, S. E., Brown, M. L., Pilling, D., Weeks, B. R., Myers, L. K., et al. (2015) Role of the neutrophil chemorepellent soluble dipeptidyl peptidase IV in decreasing inflammation in a murine model of arthritis, *Arthritis Rheumatol.*, **67**, 2634-2638, doi: 10.1002/art.39250.
 77. Kumanogoh, A., and Kikutani, H. (2003) Immune semaphorins: a new area of semaphorin research, *J. Cell Sci.*, **116** (Pt 17), 3463-3470, doi: 10.1242/jcs.00674.
 78. Takamatsu, H., and Kumanogoh, A. (2012) Diverse roles for semaphorin-plexin signaling in the immune system, *Trends Immunol.*, **33**, 127-135, doi: 10.1016/j.it.2012.01.008.
 79. Tojima, T., Hines, J. H., Henley, J. R., and Kamiguchi, H. (2011) Second messengers and membrane trafficking direct and organize growth cone steering, *Nat. Rev. Neurosci.*, **12**, 191-203, doi: 10.1038/nrn2996.
 80. Lins, M. P., Silva, E. C. O., Silva, G. R., Souza, S. T., Medeiros, N. C., et al. (2018) Association between biomechanical alterations and migratory ability of semaphorin-3A-treated thymocytes, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1862**, 816-824, doi: 10.1016/j.bbagen.2018.01.001.

SEMAPHORIN 3A IN THE IMMUNE SYSTEM: TWENTY YEARS OF STUDY

Review

E. P. Kiseleva^{1,2*} and K. V. Rutto¹

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine", 197376 St. Petersburg, Russia; e-mail: ekissele@yandex.ru

² North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, 195067 St. Petersburg, Russia

Semaphorin 3A is a secreted glycoprotein, which was originally identified as axon guidance factor in the neuronal system, but it also possesses immunoregulatory properties. Here, the effect of semaphorin 3A on T-lymphocytes, myeloid dendritic cells and macrophages is systematically analysed on the bases of all publications available in the literature for 20 years. Expression of semaphorin 3A receptors – neuropilin-1 and plexins A – in these cells is described in details. The data obtained on human and murine cells are considered at a comparative aspect. Here for the first time we presented a comprehensive overview on the interaction of semaphorin 3A with mononuclear phagocyte system. Semaphorin signaling mostly results in changes of the cytoskeletal machinery and cellular morphology that regulate pathways involved in migration, adhesion and cell-cell cooperation of immune cells. Accumulating evidence indicates that this factor is crucially involved in various phases of immune responses, including the initiation phase, antigen presentation, effector T-cell function, inflammation phase, macrophage activation and polarization. In recent years, the interest in this field has increased significantly because semaphorin 3A participates in the pathogenesis of many human diseases and therefore can be used for treatment. Its involvement in the immune responses is important to study, because semaphorin 3A and its receptors turn to be a promising new therapeutic tools to be applied in many autoimmune, allergic and oncology diseases.

Keywords: semaphorin 3A, neuropilin-1, plexin, T-lymphocytes, dendritic cells, macrophages

УДК 62.018.2:017.12

Т-ЛИМФОЦИТЫ КАК МИШЕНИ ДЛЯ SARS-CoV-2

Обзор

© 2022 Е.М. Куклина

ФГБУН Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН,
«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН»,
614081 Пермь, Россия; электронная почта: ibis_07@mail.ru

Поступила в редакцию 19.04.2022

После доработки 17.05.2022

Принята к публикации 17.05.2022

Несмотря на многочисленные данные об отсутствии или слабой экспрессии Т-клетками главного функционального рецептора SARS-CoV-2, ангиотензин I-превращающего фермента 2 (ACE2), последние данные литературы демонстрируют способность нового коронавируса эффективно инфицировать Т-лимфоциты. Обзор посвящён анализу этих работ: он рассматривает альтернативные (ACE2-независимые) пути инфицирования клеток, определяет Т-клеточные субпопуляции, служащие наиболее вероятными мишенями SARS-CoV-2, обсуждает формат взаимодействия вируса с клеткой, включая как инфекционные, так и неинфекционные механизмы регуляции Т-лимфоцитов, а также оценивает роль вирус-зависимого поражения Т-лимфоцитов в патогенезе COVID-19. Особое внимание уделено регуляторным Т-клеткам, как потенциальным мишеням SARS-CoV-2, а также возможному участию экзосом в регуляции чувствительности к вирусу Т-лимфоцитов, присутствующих в периферических тканях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: SARS-CoV-2, Т-лимфоциты, ACE2, CD147, Treg.

DOI: 10.31857/S0320972522060069, **EDN:** AUEWQV

ВВЕДЕНИЕ

Коронавирус 2019 г., вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2), имеет тропность к широкому спектру клеток и тканей, прежде всего к эпителиальным клеткам лёгких и респираторного тракта, к сосудистому эндотелию, а также к клеткам кишечника, печени, почек, мозга [1], что обуславливает многообразие клинических проявлений и пост-ковидных осложнений. Тропность вируса определяется наличием на клетках-мишенях

рецепторов к различным поверхностным структурам вируса, в первую очередь к белку шипа (Spike, S-белок). Главным функциональным рецептором SARS-CoV-2 является ангиотензин I-превращающий фермент 2 (angiotensin I-converting enzyme 2, ACE2) — он распознает S-белок вируса, а сериновые протеазы клетки-мишени, выступая в роли корецепторов, обеспечивают проникновение вируса в клетку [1, 2]. Характер распределения ACE2 в тканях организма в целом совпадает с профилем инфицирования SARS-CoV-2 [1].

Клетки иммунной системы и, в частности Т-лимфоциты, первоначально не рассматривались в качестве потенциальных мишеней SARS-CoV-2, исходя из данных об отсутствии экспрессии рецептора для вируса (ACE2) в лимфоидных органах — селезёнке, тимусе и лимфатических узлах человека [3], а также в различных субпопуляциях циркулирующих Т-лимфоцитов [4]. Однако интенсивные исследования последних лет позволили идентифицировать альтернативные рецепторы SARS-CoV-2, некоторые из

Принятые сокращения: ACE2 — ангиотензин I-превращающий фермент 2; ASGR1 — асиалогликопротеиновый рецептор I; AXL — рецепторная тирозинкиназа; CD — мембранные маркёры лейкоцитов; COVID — болезнь, вызываемая коронавирусом; KREMEN1 — Kringle-домен-содержащий трансмембранный белок I; MOI — множественность заражения; N-белок — нуклеокапсидный белок; RBD — рецептор-связывающий домен; S-белок — белок шипа вируса; SARS-CoV — коронавирус, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром; TCR — Т-клеточный рецептор; Treg — регуляторные Т-лимфоциты.

которых представлены на мембране Т-клеток. Так, трансмембранный гликопротеин CD147 [5] конститутивно экспрессируется интактными CD4⁺/CD8⁺ Т-лимфоцитами периферической крови человека и существенно усиливает экспрессию в ответ на поликлональную активацию клеток [5], так же, как и другой кандидат на роль рецептора для SARS-CoV-2 — рецепторная тирозинкиназа AXL [6, 7]. А экспрессия гена Kringle-домен-содержащего трансмембранного белка 1 (Kringle containing transmembrane protein 1, KREMEN1) выявлена в субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) [8, 9]. И хотя в традиционных тканях-мишенях вируса эти рецепторы играют вспомогательную роль [7, 8], они могут выходить на первый план в ACE2-дефицитных клетках — например, в иммунных.

Эти данные подняли вопрос о Т-лимфоцитах, как о потенциальных мишенях нового коронавируса. На сегодняшний день имеется 6 независимых работ, с разной степенью детализации продемонстрировавших способность нового коронавируса SARS-CoV-2 инфицировать Т-лимфоциты человека. Настоящий обзор посвящён анализу данных работ, обсуждению возможных механизмов инфицирования Т-клеток и вклада этих механизмов в патогенез COVID-19.

РЕЦЕПТОРЫ SARS-CoV-2

Молекула ACE2, ключевой компонент ренин-ангиотензиновой системы, идентифицирована как основной входной рецептор для SARS-CoV-2 [1, 2], так же, как и для родственного коронавируса 2003 г., SARS-CoV-1 [10]. ACE2 связывается с S-белком SARS-CoV-2 через C-терминальный домен S1-субъединицы, так называемый рецептор-связывающий домен (receptor-binding domain, RBD) [1, 2]. Следующим шагом в ACE2-зависимом инфицировании клетки SARS-CoV-2 является протеолитическое расщепление S-белка вируса между S1/S2-субъединицами и при S2'-сайте, что приводит к высвобождению фузогена — фактора, обеспечивающего слияние оболочки вируса с мембраной клетки-мишени [2]. Слияние может происходить двумя путями — на клеточной мембране после связывания рецептора или в эндосоме после поглощения вириона. В последнем случае оболочка вируса сливается с эндосомальной мембраной. Расщепление S-белка осуществляется сериновыми протеазами клетки-хозяина, в пер-

вую очередь TMPRSS2 и фурином [2, 11]. Эндосомальные цистеиновые протеазы, катепсины В и L (CatB/L), также вносят вклад в этот процесс, хотя делают это только альтернативным путём, после эндоцитоза вириона [2]. Молекула ACE2 широко представлена в тканях человека с максимальной экспрессией на альвеолярных и бронхиальных эпителиальных клетках, энтероцитах, сосудистом эндотелии [1, 3]. Такой характер распределения рецепторов совпадает с профилем инфицирования SARS-CoV-2 [1], но не объясняет преимущественного повреждения клеток лёгких и дыхательных путей. Фурин также выявляется повсеместно, тогда как экспрессия TMPRSS2 носит ограниченный характер с максимумом как раз на пневмоцитах, что, как полагают, вносит вклад в распространение вируса и специфику патологии [12, 13].

Однако ACE2 — не единственный рецептор SARS-CoV-2. Недавние исследования выявили ещё целый ряд кандидатов на эту роль. Первый и главный из них — CD147, трансмембранный белок семейства иммуноглобулинов (известный также как басигин или EMMPRIN), участвующий в инвазии *Plasmodium falciparum* [14], некоторых бактериальных и вирусных инфекциях [15, 16], включая и коронавирус 2003 г., SARS-CoV-1 [17]. В 2020 г. Wang et al. [5] сообщили о прямом взаимодействии CD147 с S-белком SARS-CoV-2 и его участии в инфицировании клетки вирусом — на основе связи инфективности SARS-CoV-2 с уровнем экспрессии CD147 на клетках-мишенях. Правда, две работы 2021 г. не выявили прямого взаимодействия CD147 с рекомбинантным S-белком SARS-CoV-2 [18, 19], равно как и изменения уровня инфицирования клеток вирусом в случае подавления экспрессии гена, кодирующего CD147 [18], или функциональной блокады данной молекулы [19]. Тем не менее последняя работа по данной проблеме [20] подтвердила результаты, полученные Wang et al. [5]. Таким образом, вопрос о роли CD147 в инфицировании клеток SARS-CoV-2 до конца не решён и требует дальнейших исследований — возможно, CD147 участвует в этом процессе не напрямую. Молекула CD147 широко представлена в различных тканях: она экспрессируется эпителиальными и нейронными клетками, а также лейкоцитами — отсюда её название, CD147, в соответствии с номенклатурой лейкоцитарных дифференцировочных антигенов [4].

Другие кандидаты на роль рецепторов, обеспечивающих вход SARS-CoV-2 в клетку, —

рецепторная тирозинкиназа AXL [7], а также трансмембранный белок KREMEN1 и асиалогликопротеиновый рецептор 1 (Asialoglycoprotein receptor 1, ASGR1) [8].

Рецепторная тирозинкиназа AXL широко представлена в различных органах и тканях человека и регулирует многие физиологические процессы, включая клеточное выживание, пролиферацию и дифференцировку [21, 22]. Показано, что она специфически связывается с *N*-терминальным доменом S1-субъединицы S-белка SARS-CoV-2, но не с классическим RBD [7], и опосредует вход вируса в клетку: блокада экспрессии AXL существенно снижает инфицирование клеток лёгочной линии SARS-CoV-2, тогда как сверхэкспрессия этого фактора промотирует вирусную инфекцию [7]. Тем не менее репликация вируса в клетках лёгких лишь незначительно подавляется на фоне блокады AXL [7], указывая на второстепенную роль данного фактора в традиционных мишенях SARS-CoV-2.

Два дополнительных рецептора для вируса — трансмембранные белки ASGR1 и KREMEN1: ASGR1 опосредует эндоцитоз и лизосомальную деградацию ряда гликопротеинов, играя критическую роль в их гомеостазе [23], а KREMEN1 участвует в регуляции WNT-зависимого сигнала [24], и оба фактора служат входными рецепторами для многих вирусов [25], включая и новый коронавирус. Молекулы ASGR1 и KREMEN1 напрямую взаимодействуют с S-белком SARS-CoV-2 (как с *N*-терминальным доменом, так и с RBD), причём аффинность их связывания сопоставима с таковой для ACE2 [8, 26]. Эктопической экспрессии ASGR1 или KREMEN1 достаточно для входа SARS-CoV-2 в клетку [8], однако избыточная экспрессия этих рецепторов в ACE2-негативных клетках лишь частично восстанавливает инфективность SARS-CoV-2, с существенно меньшей эффективностью, чем в ACE2-позитивных [8].

Каждый из четырёх альтернативных рецепторов (CD147/AXL/KREMEN1/ASGR1) потенциально может опосредовать вход SARS-CoV-2 в клетку независимо от ACE2, обеспечивая дополнительные пути инфицирования вирусом различных тканей, хотя в традиционных ACE2-позитивных мишенях вируса их роль вторична.

В отличие от независимых рецепторов, есть ряд мембранных молекул, способных усиливать инфективность SARS-CoV-2, таких как нейропилин-1 [27], сиаловые кислоты [28], гепаран-

сульфаты [29] или лектиновые рецепторы [30].

Нейропилин-1 напрямую связывается с полиосновным мотивом в расщеплённой фурином S1-субъединице S-белка вируса и заметно усиливает инфицирование клетки: блокада такого взаимодействия с помощью РНК-интерференции или селективных ингибиторов снижает вход SARS-CoV-2 в клетку [27]. При этом нейропилин-1 не способен вызывать инфицирование клетки вирусом самостоятельно, но эффективно делает это в случае коэкспрессии с ACE2 и TMPRSS2 [27]. Гепарансульфат — другой необходимый фактор, усиливающий инфицирование различных клеток-мишеней SARS-CoV-2 [29]. Он взаимодействует с RBD S-белка вируса в сайте, не перекрывающимся с мотивом, участвующим в контакте с ACE2. Связывание гепарансульфата инициирует трансформацию S-белка из закрытой конформации в открытую, повышая доступность RBD для связывания ACE2 [29]. Некоторые лектиновые рецепторы также участвуют в инфицировании клетки SARS-CoV-2 за счёт связывания гликанов, ассоциированных с S-белком [30]. Большинство лектинов С-типа взаимодействуют с сайтом S-белка за пределами RBD. И хотя такое связывание не способно напрямую индуцировать инфицирование клетки SARS-CoV-2, лектиновые рецепторы усиливают вход вируса в ACE2-позитивные клетки, выступая в качестве неспецифических «молекул прикрепления» для SARS-CoV-2 [30]. К тому же *N*-терминальный домен S1-субъединицы S-белка вируса содержит мотивы, связывающие сиаловые кислоты, и эти мотивы могут опосредовать взаимодействие вируса с различными сиалопротеинами, гликопротеинами или ганглиозидами на клеточной мембране [28]. Таким образом, хотя перечисленные выше неспецифические молекулы не являются самодостаточными, они вносят существенный вклад в инфицирование клетки SARS-CoV-2 — либо обеспечивая лучшее прикрепление вируса к поверхности клетки-мишени, либо изменяя конформацию S-белка, что приводит к появлению дополнительных сайтов связывания с рецептором или повышает доступность RBD для контакта с ACE2.

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ SARS-CoV-2 Т-ЛИМФОЦИТАМИ

Вопрос о наличии у Т-лимфоцитов главного функционального рецептора SARS-CoV-2 на

сегодняшний день является спорным. В 2004 г. Hamming et al. [3] продемонстрировали с помощью иммуногистохимического анализа отсутствие экспрессии ACE2 в лимфоцитах центральных и периферических лимфоидных органов человека, а именно: тимуса (число исследованных образцов, $n = 4$), селезёнки ($n = 4$) и лимфатических узлов ($n = 6$). Именно на эту работу до недавнего времени ссылались большинство авторов, высказывая сомнение в возможности инфицирования Т-клеток вирусом SARS-CoV-2 [31]. В подтверждение этих данных в 2020 г. Radzikowska et al. [4] показали отсутствие экспрессии генов, кодирующих ACE2 и TMPRSS2 в различных субпопуляциях Т-лимфоцитов периферической крови человека, включая наивные CD4⁺/CD8⁺ Т-лимфоциты и терминально дифференцированные эффекторные CD4⁺/CD8⁺ Т-клетки — правда, опять на ограниченной группе ($n = 4$). В то же время Bertram et al. [32] продемонстрировали, также с помощью иммуногистохимии, высокую стабильную экспрессию ACE2 и TMPRSS2 в лимфоидных клетках различных тканей респираторного и желудочно-кишечного тракта, включая респираторный синус, слизистые миндалины и ворсинки кишечника. А ещё в одном исследовании с помощью секвенирования РНК на уровне отдельного ядра (single-nuclei RNA sequencing analysis) [33] показана заметная экспрессия гена, кодирующего TMPRSS2, и в следовых количествах гена, кодирующего ACE2, Т-лимфоцитами, присутствующими в здоровой ткани лёгких онкологических пациентов ($n = 12$). Противоречия в представленных выше данных нет. В первом случае объектом исследования являлись преимущественно Т-клеточные предшественники или наивные Т-лимфоциты, тогда как во втором случае речь, по-видимому, идёт либо о лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми, либо об активированных Т-лимфоцитах, инфильтрирующих периферические ткани. Кроме того, размеры исследованных групп невелики, а экспрессия ACE2 генетически детерминирована. В итоге, имеющиеся на сегодняшний день данные позволяют говорить об отсутствии конститутивной экспрессии ACE2 и TMPRSS2 основной популяцией Т-лимфоцитов, наивными $\alpha\beta$ Т-клетками, но не исключают присутствия данных молекул на отдельных Т-клеточных субпопуляциях, а также их появления в условиях стимуляции или провоспалительного окружения, особенно учитывая, что ген, кодирующий ACE2, является ин-

терферон-стимулируемым [34], а Т-лимфоциты активно отвечают на интерфероны.

Кроме того, возможен и ещё один механизм появления ACE2 на Т-клеточной мембране — он связан с экзосомами: клетки, не экспрессирующие или слабо экспрессирующие рецептор SARS-CoV-2, могут получать этот рецептор от других клеток с помощью экстраклеточных микровезикул, которые высвобождаются от поверхности любых клеток в норме или при стимуляции, содержат биомолекулы, такие как РНК и белки, и осуществляют межклеточную коммуникацию [35]. Известно, что ACE2 является традиционным компонентом микровезикул, которые способны переносить его в совместной культуре от клеток со сверхэкспрессией ACE2 клеткам-реципиентам, лишённым данного фактора [36]. Более того, в недавней работе показано присутствие ACE2⁺-микровезикул в плазме больных COVID-19 — их уровень имел высокую вариабельность и в целом был сопоставим с таковым у здоровых доноров, однако в группе больных COVID-19 количество ACE2⁺-микровезикул коррелировало с тяжестью заболевания [37].

В отличие от ACE2, недавно идентифицированный новый функциональный рецептор SARS-CoV-2, трансмембранный гликопротеин CD147 [5], конститутивно экспрессируется на мембране интактных CD4⁺/CD8⁺ Т-лимфоцитов периферической крови человека и существенно усиливает экспрессию в ответ на поликлональную активацию клеток [5], так же, как и другой кандидат на роль рецептора для SARS-CoV-2 — рецепторная тирозинкиназа AXL [6]. А экспрессия гена трансмембранного белка KREMEN1 выявлена в субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов [9].

Таким образом, хотя вопрос об экспрессии Т-лимфоцитами главного функционального рецептора ACE2 не до конца ясен, убедительно подтверждено присутствие на мембране клеток альтернативных рецепторов SARS-CoV-2. И даже если в традиционных мишенях эти рецепторы играют второстепенную роль, они могут выходить на первый план в клетках с низкой экспрессией ACE2 или её отсутствием — например, в иммунных клетках.

Важно также отметить, что недавнее структурное компьютерное исследование иммунных рецепторов выявило целый ряд новых потенциальных мишеней SARS-CoV-2: показано, что молекулы CD26, CD2, CD56, CD7, CCR9, CD150, CD4, CD50, XCR1 и CD106, теоретиче-

ски, имеют более высокую аффинность связывания с RBD S-белка вируса, чем классический рецептор ACE2 [38]. Многие из этих молекул экспрессируются Т-лимфоцитами и даже служат маркерами Т-клеточных субпопуляций (например, CD2, CD7, CD4), но их участие в инфицировании требует экспериментального подтверждения.

Т-ЛИМФОЦИТЫ И SARS-CoV-2

Инфицирование Т-лимфоцитов SARS-CoV-2.

Несмотря на данные об отсутствии экспрессии Т-лимфоцитами молекулы ACE2 [3], для родственного коронавируса SARS-CoV-1, использующего тот же функциональный рецептор, показана способность эффективно инфицировать Т-клетки: у 27% пациентов с SARS-CoV-1 выявлено присутствие вирусных частиц (электронная микроскопия) и мРНК (гибридизация *in situ* и RT-PCR) в циркулирующих Т-лимфоцитах (CD3⁺-клетках), а также во вторичных лимфоидных органах — селезёнке и лимфатических узлах [39]. И лимфопению, сопровождающую данное заболевание, авторы связывают именно с поражением вирусом иммунной системы [39].

Неудивительно, что аналогичные исследования в отношении нового коронавируса SARS-CoV-2 начались с момента его идентификации.

Первой вышла работа Wang et al. [5]. Авторы выявили вирионы SARS-CoV-2 в Т-лимфоцитах (CD3⁺-клетках), инфильтрирующих лёгочные ткани больных COVID-19 [5], а в эксперименте *in vitro* с помощью люциферазного репортёрного анализа продемонстрировали дозозависимое инфицирование CD4⁺/CD8⁺ Т-лимфоцитов периферической крови человека ($n = 6$) псевдовиром SARS-CoV-2, существенно более эффективное в случае предварительной поликлональной активации Т-клеток (анти-CD3/CD28) [5].

В марте 2022 г. была опубликована работа Shen et al. [40], которая, расширив спектр используемых методов исследования, в целом подтвердила представленные выше результаты. Так, показано присутствие антигена SARS-CoV-2 (нуклеокапсидного белка, N-белка) в Т-лимфоцитах (CD3⁺-клетках) периферической крови и постмортальных срезов лёгких больных COVID-19 [40], причём для клеток периферической крови показан существенно более высокий уровень N-белка в CD4⁺ Т-лимфоцитах по сравнению с таковым в CD8⁺-клетках

больных COVID-19 [40]. При инфицировании вирусом CD4⁺ Т-клеточных линий Jurkat или MT4 *in vitro* (множественность заражения (Multiplicity of infection, MOI) равна 0,01) в клетках регистрировали вирусную РНК (район, кодирующий RBD), субгеномную вирусную РНК (маркер репликации вируса в клетке), а также вирусный белок (N-белок — вестерн-блоттингом/проточной цитометрией) и вирусные частицы (электронной микроскопией). Оценка инфективности вируса в отношении первичных Т-лимфоцитов периферической крови здоровых доноров ($n = 3$) также продемонстрировала присутствие вирусной РНК (RBD), более высокое в предварительно активированных (CD3/CD28/IL-2) Т-клетках [40]. При этом авторы выявили массивированный апоптоз в Т-лимфоцитах, инфицированных вирусом *in vitro*, а также повышенный уровень апоптотических Т-лимфоцитов в периферической крови больных COVID-19 по сравнению с Т-клетками здоровых доноров [40].

Ещё две работы, непосредственно относящиеся к обсуждаемой проблеме, находятся в настоящее время на этапе препринта, но определённо заслуживают обсуждения, поскольку перекликаются с предыдущими. В первой из них показана способность SARS-CoV-2 (MOI = 0,1) инфицировать *in vitro* CD4⁺, но не CD8⁺ Т-лимфоциты периферической крови здоровых доноров, что подтверждено на уровне вирусной РНК, вирусного белка (S-белка SARS-CoV-2, иммунофлуоресценцией), а также вирусных частиц (электронной микроскопией) [41]. При этом в инфицированных CD4⁺ Т-клетках выявлена негативная (антисмысловая) РНК SARS-CoV-2, что указывает на репликацию вируса [41]. В подтверждение этих результатов, исследования *ex vivo* выявили присутствие вирусной РНК в CD4⁺, но не в CD8⁺ Т-лимфоцитах периферической крови больных COVID-19, причём вирусная нагрузка напрямую зависела от тяжести заболевания [41].

Во второй работе, находящейся на этапе препринта, инфицирование мононуклеарных клеток периферической крови здоровых доноров ($n = 5$) вирусом SARS-CoV-2 (MOI = 1) *in vitro* выявило присутствие вирусных антигенов как в CD4⁺-, так и в CD8⁺ Т-клетках (~13–14%, проточной цитометрией с использованием гипериммунной сыворотки мышей, иммунизированных SARS-CoV-2) [42]. При этом процесс сопровождался выраженным апоптозом обеих Т-клеточных субпопуляций: до 70% SARS-CoV-

2-инфицированных клеток имели апоптотические изменения [42]. Кроме того, у больных COVID-19 ($n = 22$) показано присутствие вирус-инфицированных $CD4^+$ Т-лимфоцитов в периферической крови (иммунофлуоресцентным анализом с использованием для выявления вирусных антигенов сыворотки выздоровевших пациентов), и у основной части Т-клеток, несущих вирусные антигены, выявлена двунитевая РНК SARS-CoV-2, маркёр репликации [42]. А данные посмертного иммуногистохимического исследования показали присутствие инфицированных вирусом $CD4^+$ Т-лимфоцитов в тканях лёгких больных COVID-19 [42].

Наряду с представленными выше работами, вирусная РНК регистрировалась в Т-лимфоцитах ($CD3^+$ -клетках), присутствующих в образцах бронхоальвеолярного лаважа ($n = 6$) и мокроты ($n = 2$) тяжёлых больных COVID-19 [43]. А белки SARS-CoV-2 и вирионы выявлялись в клетках селезёнки и лимфатических узлов при посмертном исследовании тканей больных COVID-19 [44], хотя в последнем случае тип инфицированных клеток не определялся.

Рецепторы, опосредующие инфицирование Т-лимфоцитов SARS-CoV-2. Практически во всех представленных выше работах по инфицированию Т-лимфоцитов SARS-CoV-2 основной вирусный рецептор и корецептор ACE2/TMPRSS2 либо не выявлялись на инфицированных Т-клетках [5, 43], либо не участвовали в инфицировании, что подтверждалось ингибиторным анализом с помощью подавления экспрессии гена, кодирующего ACE2, и/или функциональной блокады рецепторов [40]. Единственное исключение — работа Davanzo et al. [41], в которой инфицирование $CD4^+$ Т-лимфоцитов периферической крови SARS-CoV-2 *in vitro* эффективно снижалось на фоне блокады ACE2 и TMPRSS2. В то же время показано участие альтернативных рецепторов SARS-CoV-2 в этом процессе. Так, в клетках-мишенях вируса выявлена экспрессия CD147, существенно возрастающая в ответ на активацию [5, 43], а инфицирование *in vitro* $CD4^+/CD8^+$ Т-лимфоцитов человека псевдовиром SARS-CoV-2 отменялось моноклональными антителами к CD147 [5]. Другой альтернативный рецептор SARS-CoV-2, тирозинкиназа AXL, выявлен на уровне мРНК в вирус-инфицированных Т-лимфоцитах больных COVID, а в Т-клетках линии Jurkat сверхэкспрессия AXL усиливала (в 1,5 раза) инфицирование клеток вирусом, хотя нокдаун гена не оказывал влияния на этот

процесс, указывая на то, что AXL — не главный рецептор входа вируса в Т-клетки данной линии, но может вносить вклад в инфицирование [40].

Работа Davanzo et al. [41], продемонстрировавшая участие в процессе инфицирования Т-лимфоцитов маркера Т-хелперной субпопуляции, мембранной молекулы CD4, заслуживает особого внимания: показана копреципитация S-белка SARS-CoV-2 и рекомбинантной полноразмерной молекулы CD4, а инфицирование $CD4^+$ Т-лимфоцитов периферической крови SARS-CoV-2 *in vitro* дозозависимо подавлялось в случае предобработки клеток моноклональными антителами к CD4, хотя и менее эффективно, чем на фоне блокады традиционного для вируса рецептора ACE2 и протеазы TMPRSS2. Интересно, что те же моноклональные антитела против CD4 способны блокировать вход в $CD4^+$ Т-клетки вируса иммунодефицита человека (Human immunodeficiency virus, HIV) [45], причём в случае HIV-инфекции одного CD4 также недостаточно для входа вируса в клетку, он действует совместно с корецепторами, в частности, хемокиновыми рецепторами CCR5 или CXCR4 [46].

В итоге, на сегодняшний день имеется 6 независимых работ, с разной степенью детализации продемонстрировавших способность нового коронавируса SARS-CoV-2 инфицировать Т-лимфоциты человека. Как правило, речь идёт о Т-клетках, инфильтрирующих поражённые ткани больных COVID-19 [5, 40, 42, 43] или о периферической крови пациентов [40–42], однако в четырёх работах инфицирование вирусом [40–42] или псевдовиром [5] *in vitro* показано и для Т-лимфоцитов периферической крови здоровых доноров. Размер исследуемых групп невелик, но результаты хорошо согласуются друг с другом (таблица). Так, большинство авторов отмечает исключительное [41, 42] или преимущественное [40] инфицирование вирусом субпопуляции $CD4^+$ Т-лимфоцитов, и работа Davanzo et al. [41] даёт объяснение этому феномену, демонстрируя участие молекулы CD4 в инфицировании клетки SARS-CoV-2. Поражение вирусом обеих Т-клеточных субпопуляций ($CD4^+/CD8^+$ Т-клеток), показанное Pontelli et al. [42] в эксперименте *in vitro*, связано, по-видимому, с избыточным количеством вирионов, вносимых в культуру в расчёте на клетку-мишень ($MOI = 1,0$), поскольку в других работах этот показатель существенно ниже — $MOI = 0,1$ [41] или $MOI = 0,01$ [40].

Инфицирование Т-лимфоцитов* SARS-CoV-2

Тип Т-клеток	Локализация Т-клеток	Рецептор/ корепептор	Выявляемый вирусный материал	Ссылки
Т-лимфоциты в тканях больных COVID-19				
CD3 ⁺ Т-клетки	лёгкие	н/о	N-белок вируса	[40]
			антигены вируса**	[42]
			вирионы	[5]
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	бронхоальвеолярный лаваж, мокрота	н/о	РНК вируса	[43]
Т-клетки	периферическая кровь	н/о	РНК вируса	[41]
			двунитевая РНК вируса	[42]
CD4 ⁺ Т-клетки	периферическая кровь	н/о	антигены вируса	[42]
Т-лимфоциты здоровых доноров, инфицированные <i>in vitro</i>				
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	периферическая кровь	CD147***	РНК вируса	[5]
		AXL?	РНК вируса	[40]
Т-клетки		н/о	антигены вируса	[42]
CD4 ⁺ Т-клетки	периферическая кровь	ACE2/	РНК вируса	[41]
		TMPRSS2	антисмысловая РНК вируса	
		CD4	S-белок вируса, вирионы	

Примечание. N-белок – нуклеокапсидный белок, S-белок – белок шипа вируса; н/о – рецепторы/корепепторы не определялись.

* В таблице представлены данные только по инфицированию первичных Т-лимфоцитов, не Т-клеточных линий. Информация о методах выявления вирусного материала и оценки вклада конкретных рецепторов в инфицирование клетки, а также о размере исследуемых групп – в тексте.

** Вирусные антигены не идентифицировались, они выявлялись с помощью сывороток мышей, иммунизированных SARS-CoV-2, или выздоровевших пациентов.

*** Представлены только рецепторы/корепепторы, для которых экспериментально подтверждено участие в инфицировании Т-лимфоцитов SARS-CoV-2.

Т-клетки, инфицированные SARS-CoV-2 *in vitro*, подвергались выраженному апоптозу [40, 42], и в периферической крови больных COVID-19 уровень апоптотических Т-лимфоцитов также был повышен по сравнению с Т-клетками здоровых доноров [40]. Следует отметить, что апоптоз является закономерным результатом инфицирования клетки вирусом, он может быть как следствием прямого воздействия вируса, так и классическим ответом иммунной системы на появление в организме клетки, несущей чужеродные антигены.

В инфицированных вирусом первичных CD4⁺ Т-лимфоцитах и CD4⁺ Т-клеточных линиях Jurkat и MT4 различными способами регистрировали субгеномную вирусную РНК [40], негативную (антисмысловую) РНК SARS-CoV-2 [41] или двунитевую РНК вируса [42], то есть маркёры репликации вируса в клетке, однако данных о сборке вирусных частиц и их выходе из заражённой клетки пока нет. Ни одна из имеющихся на сегодняшний день работ не позволяет однозначно сказать, является ли инфицирование вирусом Т-лимфоцитов про-

дуктивным или абортным. В исследовании Pontelli et al. [42] продуктивность инфекции подтверждена для нефракционированного пула мононуклеарных клеток периферической крови, но для Т-лимфоцитов таких данных нет.

Неинфекционные механизмы вирус-зависимой регуляции Т-лимфоцитов. Говоря об инфицировании Т-лимфоцитов SARS-CoV-2, следует учитывать, что даже в случае непродуктивного взаимодействия вируса с клеткой SARS-CoV-2-зависимый сигнал может регулировать клеточную активность — об этом свидетельствуют данные двух недавних исследований.

Так, с помощью структурного компьютерного моделирования показано, что S-белок SARS-CoV-2, но не других коронавирусов, содержит структурные мотивы, имеющие высокое сходство с таковыми у бактериальных суперантигенов (то есть антигенов, вызывающих массовую неспецифическую активацию Т-лимфоцитов), и способен напрямую связываться с антигенным рецептором Т-лимфоцита (Т cell receptor, TCR) [47]. Следствием этого должна быть избыточная активация Т-клеточного звена иммунной системы, и данный механизм может вносить вклад в гипертрофический синдром, характерный для COVID-19. В подтверждение этого у больных COVID-19 с гипертрофическим выявлен нетипичный (искажённый) репертуар TCR, характерный для активации суперантигеном, в отличие от пациентов с лёгким или умеренным течением COVID-19 [47].

Другой кандидат на роль регулятора Т-клеточной активации — вирусный фузоген, или белок, обеспечивающий слияние оболочки вируса с мембраной клетки-мишени — вернее, не сам белок, а соответствующий домен в составе S-белка SARS-CoV-2. Известно, что фузоген родственного коронавируса 2003 г., SARS-CoV-1, участвует не только в инфицировании Т-клеток, но и в прямом ингибировании TCR-зависимого сигнала: анализ его первичной последовательности показал, что фузогенный домен S-белка SARS-CoV-1 имитирует трансмембранный домен α -цепи TCR и может нарушать взаимодействия между цепями TCR-комплекса, препятствуя антиген-зависимой сигнализации — его специфическая иммуносупрессивная активность подтверждена в эксперименте *in vivo* на модели коллаген-индуцированного артрита у мышей [48]. Учитывая близкое сходство аминокислотной последовательности фузогена SARS-CoV-2 с соответ-

ствующим белком SARS-CoV-1, а также с последовательностью трансмембранного домена α -цепи TCR, высокая вероятность такого механизма предполагается и для нового коронавируса, хотя это ещё нужно показать [49].

ИНФИЦИРОВАНИЕ Т-ЛИМФОЦИТОВ SARS-CoV-2 И ПАТОГЕНЕЗ COVID-19

Новая коронавирусная инфекция сопровождается существенными изменениями в работе иммунной системы, и потенциальная способность SARS-CoV-2 инфицировать Т-лимфоциты может иметь прямое отношение к целому ряду феноменов, ассоциированных с болезнью. Первый и наиболее очевидный — лимфопения, которая выявляется у большинства больных COVID-19 [50, 51] и ассоциирована с тяжестью заболевания [50, 51]. Инфицирование Т-клеток вирусом и индукция апоптоза в этих клетках вносит, по-видимому, существенный вклад в развитие лимфопении при COVID-19, а возможно, и является его основной причиной.

Функциональное истощение Т-лимфоцитов — также часто регистрируемая ситуация у больных COVID-19 [52, 53]. Это вариант Т-клеточной дисфункции, при котором кратковременная гиперактивация Т-лимфоцита в ответ на антиген сменяется прогрессивным снижением пролиферативной активности, утратой эффекторных функций, экспрессией ингибиторных рецепторов, таких как PD-1 и CTLA, эпигенетическим и транскрипционным репрограммированием [52, 53]. Частично за снижение функций Т-клеток при COVID-19 может быть ответственна их непродуктивная инфекция SARS-CoV-2, а также неинфекционные механизмы регуляции вирусом Т-лимфоцитов, связанные с непосредственным взаимодействием вирусного S-белка с TCR и блокадой или искажением антиген-зависимого сигнала.

Третий феномен, ассоциированный с новой коронавирусной инфекцией, — это неконтролируемая избыточная воспалительная реакция (цитокиновый шторм), которая является одной из наиболее частых причин летального исхода при COVID-19 [50, 51]. Как правило, гипертрофическое воспаление при данной патологии связывают с неадекватной активацией клеток неспецифической защиты — основных продуцентов провоспалительных факторов в организме [50, 51], однако клетки адаптивного им-

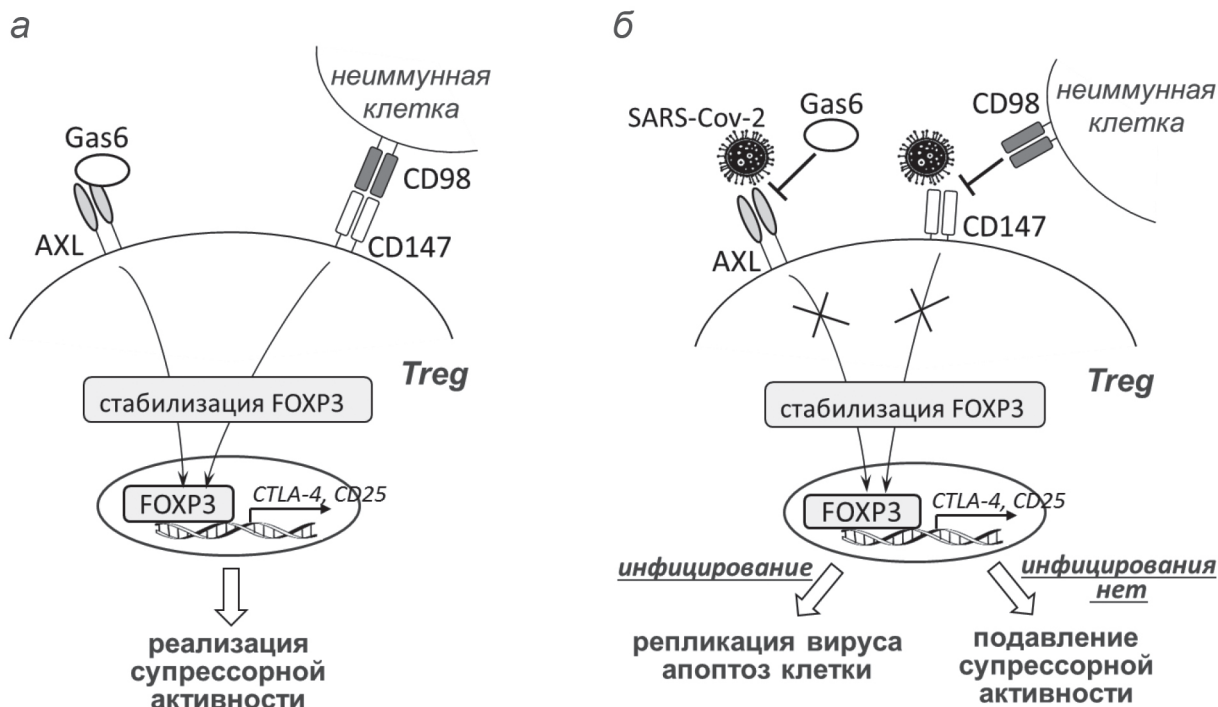
мунитета и, в частности Т-лимфоциты, должны играть непосредственную роль в этом процессе. В первую очередь речь идёт о субпопуляции регуляторных Т-клеток, Treg, которые в контексте данной работы заслуживают отдельного обсуждения.

SARS-CoV-2 и регуляторные Т-лимфоциты. Т-хелперная субпопуляция Treg играет ключевую роль в поддержании аутоотолерантности и иммунном гомеостазе: естественные Treg (natural Treg, nTreg) созревают в тимусе, и их основной задачей является подавление иммунного ответа на аутоантигены, а индуцибельные Treg (inducible Treg, iTreg) формируются на поздних стадиях любого иммунного ответа и призваны ограничить избыточное воспаление, предупреждая повреждение тканей продуктами активированных иммунных клеток.

Целый ряд данных указывает на Treg, как на вероятную мишень SARS-CoV-2. Так, молекула CD147, альтернативный входной рецептор для вируса, опосредующий инфицирование первичных Т-лимфоцитов [5],

имеет повышенную экспрессию на мембране Treg, причём маркирует активированные клетки (CD45R0⁺ Treg) с высокой супрессивной активностью [54]. Уровень CD147 на мембране Treg коррелирует с экспрессией главного транскрипционного фактора и маркера данной субпопуляции, FoxP3 [54]. Более того, для поддержания стабильной экспрессии FoxP3 регуляторным клеткам необходим сигнал, который они получают как раз через CD147 при связывании его с физиологическим лигандом CD98, экспрессируемым неиммунным окружением [55]. Показано, что индуцибельные Treg с высокой экспрессией CD147 (CD147^{high} iTreg) эффективно подавляют воспалительный ответ в модели экспериментальных колитов у гуманизированных мышей, в отличие от аналогичных клеток с низкой экспрессией CD147 (CD147^{low} iTregs) [55].

Экспрессия двух других рецепторов SARS-CoV-2, трансмембранного белка KREMEN1 и рецепторной тирозинкиназы AXL, также выявлена в субпопуляции Treg [9, 56], причём AXL



Потенциальные механизмы взаимодействия SARS-CoV-2 с регуляторными Т-лимфоцитами. Молекулы CD147 и AXL имеют высокую экспрессию на мембране Treg и вовлечены в их функционирование: сигналы, которые клетки получают при связывании этих молекул с эндогенными лигандами CD98/Gas6, необходимы для поддержания стабильной экспрессии ключевого транскрипционного фактора FoxP3 (а). Одновременно CD147 и AXL служат входными рецепторами SARS-CoV-2, причём встреча Treg с вирусом может приводить как к инфицированию клетки, так и к её неинфекционной регуляции (б): в первом случае клетка-мишень, как правило, подвергается апоптозу, тогда как при отсутствии инфицирования вирус, связываясь с CD147/AXL, может конкурентно ингибировать взаимодействие этих рецепторов с эндогенными лигандами (CD98/Gas6), препятствуя таким образом стабилизации клеток и реализации их супрессорной активности. Подробные пояснения — в тексте статьи

играет в функционировании этих клеток, по-видимому, такую же роль, как и CD147: её эндогенный лиганд Gas6 (Growth arrest-specific) дозозависимо повышает *in vivo* и *in vitro* экспрессию транскрипционного фактора FoxP3 в CD4⁺CD25⁺ Tregs и усиливает супрессорную активность регуляторных Т-клеток в отношении эффекторных CD4⁺ Т-лимфоцитов, причём действие Gas6 *in vitro* отменяется полностью или частично в случае нокдауна гена, кодирующего AXL или функциональной блокады этого рецептора [56].

Вопрос об инфицировании Treg коронавирусом пока нигде не поднимался, но этот вариант весьма вероятен и требует проверки. Кроме того, даже при отсутствии инфицирования регуляторных Т-клеток SARS-CoV-2 может связываться с мембранными рецепторами этих клеток CD147/AXL и конкурентно ингибировать их взаимодействие с эндогенными лигандами (CD98/Gas6), препятствуя таким образом стабилизации клеток и реализации их супрессорной активности (рисунок). Именно с прямым действием вируса на регуляторные Т-клетки может быть связано существенное снижение количества Treg в циркуляции у пациентов с тяжёлым течением COVID-19 [50, 57]. А поскольку субпопуляция Treg играет ключевую роль в ограничении избыточного иммунного ответа, снижение численности и/или активности этих клеток должно вносить вклад в неконтролируемую воспалительную реакцию (цитокиновый шторм), ассоциированную с тяжёлым течением COVID-19, а возможно, и играть ключевую роль в этом процессе. Кроме того, поражение Treg вирусом может иметь отношение к феномену функционального истощения Т-лимфоцитов, препятствующему эффективному противовирусному ответу [52]: именно с нарушением контроля со стороны Treg может быть связана гиперактивация эффекторных Т-лимфоцитов, предшествующая их функциональному истощению [53].

Наконец, говоря о молекуле CD147, как о функциональном рецепторе для SARS-CoV-2, следует отметить, что она актуальна не только для Treg — данная молекула тесно связана с развитием и функционированием Т-лимфоцитов в целом. Так, CD147 высоко экспрессирован на дубль-негативных тимоцитах и участвует в их экспансии [58]. На периферии CD147 регулирует миграцию активированных Т-лимфоцитов [59] и пролиферативный ответ на поликлональную стимуляцию [60]. Как следствие,

CD147-зависимое инфицирование может регулировать Т-клеточное звено иммунитета как на этапе антигеннезависимой дифференцировки, так и при ответе Т-лимфоцита на антиген.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первые исследования взаимодействия SARS-CoV-2 с Т-лимфоцитами показали, что вирус способен инфицировать Т-клетки и что ACE2, главный функциональный рецептор вируса в неиммунных тканях, либо не участвует в этом процессе [40], либо не выявляется на вирус-позитивных Т-клетках [5, 43] — на первый план в инфицировании Т-лимфоцитов выходят альтернативные рецепторы SARS-CoV-2, в первую очередь молекулы CD147 и AXL [5, 40]. Тем не менее вопрос об экспрессии ACE2 не снимается с повестки: во-первых, несмотря на убедительное подтверждение присутствия в инфицированных Т-лимфоцитах вирусной РНК, вирусных белков и самих вирионов, уровень инфицирования Т-клеток не сопоставим с таковым для традиционных тканей-мишеней вируса [40], имеющих стабильную экспрессию ACE2; во-вторых, тот факт, что ACE2 отсутствует или слабо представлен на общей Т-клеточной популяции, не исключает экспрессии рецептора отдельными субпопуляциями Т-лимфоцитов. В этом плане в первую очередь интерес представляют регуляторные Т-лимфоциты, провоспалительные Т-хелперные субпопуляции, а также вирус-специфичные активированные CD4⁺/CD8⁺ Т-клетки, инфильтрирующие поражённые вирусом ткани. Не случайно инфицированные SARS-CoV-2 Т-клетки стабильно выявляются в тканях лёгких или в бронхоальвеолярном лаваже больных COVID-19 — в очаге поражения под действием микроокружения репертуар вирусных рецепторов и уровень их экспрессии могут меняться.

Кроме того, следует учитывать и возможность получения Т-лимфоцитами рецепторов SARS-CoV-2, в частности ACE2, от других клеток с помощью экстраклеточных микровезикул, для которых данная молекула является традиционным компонентом [36]. Вполне вероятно, что резидентные Т-клетки барьерных органов или вирус-специфичные Т-лимфоциты, инфильтрирующие поражённые ткани, с помощью таких ACE2⁺-микровезикул получают главный функциональный рецептор SARS-CoV-2 от традиционных мишеней вируса с вы-

сокой экспрессией ACE2, таких как лёгочный эпителий или эндотелий сосудов, приобретая таким образом чувствительность к вирусу. Это в том случае, если микровезикулы секретируются неинфицированными клетками. Если же клетка, секретирующая ACE2⁺-микровезикулы, вирус-позитивна, что очень вероятно для очага поражения, к рецепторам для вируса добавляется и сам вирусный материал: показано, что микровезикулы, формируемые SARS-CoV-2-инфицированными клетками, содержат РНК вируса [61] и могут участвовать в распространении инфекции.

В этой связи важно заметить, что и сами Т-лимфоциты в случае инфицирования могут участвовать в распространении вируса — Pontelli et al. [42] отводит Т-клетке в данной ситуации роль «Троянского коня». Действи-

тельно, исходя из имеющихся на настоящий момент данных, уровень инфицирования Т-лимфоцитов новым коронавирусом невысоок, продуктивность инфекции пока не подтверждена — возможно, вирус, проникая в Т-клетки, делает ставку в первую очередь на регуляцию активности этих клеток и/или на их транспортные функции.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания (тема госрегистрации № АААА-А19-119112290007-7).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., et al. (2020) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin, *Nature*, **579**, 270-273, doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
2. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., et al. (2020) SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor, *Cell*, **181**, 271-280 e8, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
3. Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M. L., Lely, A. T., Navis, G., et al. (2004) Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis, *J. Pathol.*, **203**, 631-637, doi: 10.1002/path.1570.
4. Radzikowska, U., Ding, M., Tan, G., Zhakparov, D., Peng, Y., et al. (2020) Distribution of ACE2, CD147, CD26 and other SARS-CoV-2 associated molecules in tissues and immune cells in health and in asthma, COPD, obesity, hypertension, and COVID-19 risk factors, *Allergy*, **75**, 2829-2845, doi: 10.1111/all.14429.
5. Wang, K., Chen, W., Zhang, Z., Deng, Y., Lian, J.-Q., et al. (2020) CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells, *Signal. Transduct. Target Ther.*, **5**, 283, doi: 10.1038/s41392-020-00426-x.
6. Schmid, E. T., Pang, I. K., Silva, E. A. C., Bosurgi, L., Miner, J. J., et al. (2016) AXL receptor tyrosine kinase is required for T cell priming and antiviral immunity, *eLife*, **5**, e12414, doi: 10.7554/eLife.12414.
7. Wang, S., Qiu, Z., Hou, Y., Deng, X., Xu, W., et al. (2021) AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells, *Cell Res.*, **31**, 126-140, doi: 10.1038/s41422-020-00460-y.
8. Gu, Y., Cao, J., Zhang, X., Gao, H., Wang, H., et al. (2020) Interaction network of SARS-CoV-2 with host receptome through spike protein, *BioRxiv*, doi: 10.1101/2020.09.09.287508.
9. Grigoriou, M., Banos, A., Hatzioannou, A., Kloetgen, A., Kouzis, P., et al. (2021) Regulatory T cell transcriptomic reprogramming characterizes adverse events by checkpoint inhibitors in solid tumors, *Cancer Immunol. Res.*, **9**, 726-734, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-20-0969.
10. Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Gao, H., Guo, F., et al. (2005) A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury, *Nat. Med.*, **11**, 875-879, doi: 10.1038/nm1267.
11. Hoffmann, M. A., Kleine-Weber, H., and Pöhlmann, S. (2020) Multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells, *Mol. Cell*, **78**, 779-784, doi: 10.1016/j.molcel.2020.04.022.
12. Shulla, A., Heald-Sargent, T., Subramanya, G., Zhao, J., Perlman, S., et al. (2011) A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry, *J. Virol.*, **85**, 873-882, doi: 10.1128/JVI.02062-10.
13. Iwata-Yoshikawa, N., Okamura, T., Shimizu, Y., Hasegawa, H., Takeda, M., et al. (2019) TMPRSS2 contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine models after coronavirus infection, *J. Virol.*, **93**, e01815-18, doi: 10.1128/JVI.01815-18.

14. Zhang, M. Y., Zhang, Y., Wu, X.-D., Zhang, K., Lin, P., et al. (2018) Disrupting CD147-RAP2 interaction abrogates erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*, *Blood*, **10**, 1111-1121, doi: 10.1182/blood-2017-08-802918.
15. Pushkarsky, T., Zybarth, G., Dubrovsky, L., Yurchenko, V., Tang, H., et al. (2001) CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **11**, 6360-6365, doi: 10.1073/pnas.111583198.
16. Bernard, S. C., Simpson, N., Join-Lambert, O., Federici, C., Laran-Chich, M.-P., et al. (2014) Pathogenic *Neisseria meningitidis* utilizes CD147 for vascular colonization, *Nat. Med.*, **7**, 725-731, doi: 10.1038/nm.3563.
17. Chen, Z. Mi, L., Xu, J., Yu, J., Wang, X., et al. (2005) Function of HAb18G/CD147 in invasion of host cells by severe acute respiratory syndrome coronavirus, *J. Infect. Dis.*, **5**, 755-760, doi: 10.1086/427811.
18. Shilts, J., Crozier, T. W. M., Greenwood, E. J. D., Lehner, P. J., and Wright, G. J. (2021) No evidence for basigin/CD147 as a direct SARS-CoV-2 spike binding receptor, *Sci. Rep.*, **11**, 413, doi: 10.1038/s41598-020-80464-1.
19. Ragotte, R. J., Pulido, D., Donnellan, F. R., Hill, M. L., Gorini, G., et al. (2021) Human basigin (CD147) does not directly interact with SARS-Cov-2 spike glycoprotein, *mSphere*, **6**, e0064721, doi: 10.1128/mSphere.00647-21.
20. Fenizia, C., Galbiati, S., Vanetti, C., Vago, R., Clerici, M., et al. (2021) SARS-CoV-2 entry: at the crossroads of CD147 and ACE2, *Cells*, **10**, doi: 10.3390/cells10061434.
21. Goruppi, S., Ruaro, E., and Schneider, C. (1996) Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts, *Oncogene*, **12**, 471-480.
22. Stitt, T. N., Conn, G., Gore, M., Lai, C., Bruno, J., et al. (1995) The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases, *Cell*, **80**, 661-670, doi: 10.1016/0092-8674(95)90520-0.
23. Seidah, N. G., Chretien, M., and Mbikay, M. (2018) The ever-expanding saga of the proprotein convertases and their roles in body homeostasis: emphasis on novel proprotein convertase subtilisin kexin number 9 functions and regulation, *Curr. Opin. Lipidol.*, **29**, 144-150, doi: 10.1097/MOL.0000000000000484.
24. Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., et al. (2002) Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signaling, *Nature*, **417**, 664-667, doi: 10.1038/nature756.
25. Staring, J., van den Hengel, L. G., Raaben, M., Blomen, V. A., Carette, J. I., et al. (2018) KREMEN1 is a host entry receptor for a major group of enteroviruses, *Cell Host Microbe*, **23**, 636-643.e635, doi: 10.1016/j.chom.2018.03.019.
26. Gu, Y., Cao, J., Zhang, X., Gao, H., Wang, Y., et al. (2022) Receptome profiling identifies KREMEN1 and ASGR1 as alternative functional receptors of SARS-CoV-2, *Cell Res.*, **32**, 24-37, doi: 10.1038/s41422-021-00595-6.
27. Cantuti-Castelvetri, L., Ojha, R., Pedro L. D., Djannatian, M., Franz, J., et al. (2020) Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity, *Science*, **370**, 856-860, doi: 10.1126/science.abd2985.
28. Seyran, M., Takayama, K., Uversky, V. N., Lundstrom, K., Palù, G., et al. (2020) The structural basis of accelerated host cell entry by SARS-CoV-2 dagger, *FEBS J.*, doi: 10.1111/febs.15651.
29. Clausen, T. M., Sandoval, D. R., Spliid, C. B., Pihl, J., Perrett, H. R., et al. (2020) SARS-CoV-2 infection depends on cellular heparan sulfate and ACE2, *Cell*, **183**, 1043-1057, doi: 10.1016/j.cell.2020.09.033.
30. Thépaut, M., Luczkowiak, J., Vivès, C., Labiod, N., Bally, I., et al. (2021) DC/L-SIGN recognition of spike glycoprotein promotes SARS-CoV-2 trans-infection and can be inhibited by a glycomimetic antagonist, *PLoS Pathog.*, **17**, e1009576, doi: 10.1371/journal.ppat.1009576.
31. Yan, S., and Wu, G. (2020) Is lymphopenia different between SARS and COVID-19 patients? *FASEB J.*, **35**, e21245, doi: 10.1096/fj.202002512.
32. Bertram, S., Lavender, A. H. H., Gierer, S., Danisch, S., Perin, P., et al. (2012) Influenza and SARS-coronavirus activating proteases TMPRSS2 and HAT are expressed at multiple sites in human respiratory and gastrointestinal tracts, *PLoS One*, **7**, e35876, doi: 10.1371/journal.pone.0035876.
33. Lukassen, S., Chua, R., Trefzer, T., Kahn, N. C., Schneider, M. A., et al. (2020) SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells, *EMBO J.*, **39**, e105114, doi: 10.15252/embj.20105114.
34. Ziegler, C. G. K., Allon, S. J., Nyquist, S. K., Mbano, I. M., Miao, V. N., et al. (2020) SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is enriched in specific cell subsets across tissues, *Cell*, **181**, 1016-1035.e19, doi: 10.1016/j.cell.2020.04.035.
35. Gurunathan, S., Kang, M. H., and Kim, J.-H. (2021) Diverse effects of exosomes on COVID-19: a perspective of progress from transmission to therapeutic developments, *Front. Immunol.*, **12**, 716407, doi: 10.3389/fimmu.2021.716407.
36. Wang, J., Chen, S., and Bihl, J. (2020) Exosome-mediated transfer of ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2) from endothelial progenitor cells promotes survival and function of endothelial cell, *Oxid. Med. Cell Longev.*, 4213541, doi: 10.1155/2020/4213541.
37. El-Shennawy, L., Hoffmann, A. D., Dashzeveg, N. K., Mehl, P. J., Yu, Z., et al. (2020) Circulating ACE2-expressing exosomes block SARS-CoV-2 infection as an innate antiviral mechanism, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.12.03.407031.
38. Mobini, S., Chizari, M., Mafakher, L., Rismani, E., and Rismani, E. (2021) Structure-based study of immune receptors as eligible binding targets

- of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein, *J. Mol. Graph. Model.*, **108**, 107997, doi: 10.1016/j.jmglm.2021.107997.
39. Gu, J., Gong, E., Zhang, B., Zheng, J., Gao, Z., et al. (2005) Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS, *J. Exp. Med.*, **202**, 415-424, doi: 10.1084/jem.20050828.
 40. Shen, X.-R., Geng, R., Li, Q., Chen, Y., Li, S.-F., et al. (2022) ACE2-independent infection of T lymphocytes by SARS-CoV-2, *Signal. Transduct. Target Ther.*, **7**, 83, doi: 10.1038/s41392-022-00919-x.
 41. Davanzo, G. G., Codo, A. C., Brunetti, N. S., Boldrini, V., Knittel, T. L., et al. (2020) SARS-CoV-2 uses CD4 to infect T helper lymphocytes, *MedRxiv*, doi: 10.1101/2020.09.25.20200329.
 42. Pontelli, M. C., Castro, I. A., Martins, R. B., Veras, F. P., La Serra, L., et al. (2020) Infection of human lymphomononuclear cells by SARS-CoV-2, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.07.28.225912.
 43. Ren, X., Wen, W., Fan, X., Hou, W., Su, B., et al. (2021) COVID-19 immune features revealed by a large-scale single-cell transcriptome atlas, *Cell*, **184**, 1895-1913.e19, doi: 10.1016/j.cell.2021.01.053.
 44. Bian, X.W., COVID-19 Pathology Team (2020) Autopsy of COVID-19 victims in China, *Natl. Sci. Rev.*, **7**, 1414-1418, doi: 10.1093/nsr/nwaa123.
 45. Shaik, M., Peng, H., Lu, J., Rits-Volloch, S., Xu, C., et al. (2019) Structural basis of coreceptor recognition by HIV-1 envelope spike, *Nature*, **565**, 318-323, doi: 10.1038/s41586-018-0804-9.
 46. Iliopoulou, M., Nolan, R., Alvarez, L., Watanabe, Y., Coomer, C. A., et al. (2018) A dynamic three-step mechanism drives the HIV-1 pre-fusion reaction, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 814-822, doi: 10.1038/s41594-018-0113-x.
 47. Cheng, M. H., Zhang, S., Porritt, R. A., Rivas, M. N., Paschold, L., et al. (2020) Superantigenic character of an insert unique to SARS-CoV-2 spike supported by skewed TCR repertoire in patients with hyperinflammation, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **117**, 25254-25262, doi: 10.1073/pnas.2010722117.
 48. Shen, Z. T., and Sigalov, A. B. (2016) SARS coronavirus fusion peptide-derived sequence suppresses collagen-induced arthritis in DBA/1J Mice, *Sci. Rep.*, **6**, 28672, doi: 10.1038/srep28672.
 49. Sigalov, A. B. (2022) SARS-CoV-2 may affect the immune response via direct inhibition of T cell receptor: mechanistic hypothesis and rationale, *Biochimie*, **195**, 86-89, doi: 10.1016/j.biochi.2021.11.005.
 50. Wang, F., Hou, H., Luo, Y., Tang, G., Wu, S., et al. (2020) The laboratory tests and host immunity of COVID-19 patients with different severity of illness, *JCI Insight*, **5**, doi: 10.1172/jci.insight.137799.
 51. Yang, X., Yu, Y., and Xu, J. (2020) Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study, *Lancet Respir. Med.*, doi: 10.1016/S2213-2600(20)30079-5.
 52. Diao, B., Wang, C., Tan, Y., Chen, X., Liu, Y., et al. (2020) Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), *Front. Immunol.*, **11**, 1-7, doi: 10.3389/fimmu.2020.00827.
 53. Kim, C. G., Kim, G., Kim, K. H., Park, S., Shin, S., et al. (2021) Distinct exhaustion features of T lymphocytes shape the tumor-immune microenvironment with therapeutic implication in patients with non-small-cell lung cancer, *J. Immunother. Cancer*, **9**, e002780, doi: 10.1136/jitc-2021-002780.
 54. Solstad, T., Bains, S. J., Landskron, J., Aandahl, E. M., Thiede, B., et al. (2011) CD147 (Basigin/Emmprin) identifies FoxP3⁺CD45RO⁺CTLA4⁺-activated human regulatory T cells, *Blood*, **118**, 5141-5151.
 55. Geng, J., Chen, R., Yang, F.-F., Lin, P., Zhu, Y.-M., et al. (2021) CD98-induced CD147 signaling stabilizes the Foxp3 protein to maintain tissue homeostasis, *Cell. Mol. Immunol.*, **18**, 2618-2631, doi: 10.1038/s41423-021-00785-7.
 56. Zhao, G.-J., Zheng, J.-Y., Bian, J.-L., Chen, L.-W., Dong, N., et al. (2017) Growth arrest-specific 6 enhances the suppressive function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells mainly through Axl receptor, *Mediators Inflamm.*, 6848430, doi: 10.1155/2017/6848430.
 57. Qin, C., Zhou, L., Hu, Z., Zhang, S., Yang, S., et al. (2020) Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China, *Clin. Infect. Dis.*, **71**, 762-768, doi: 10.1093/cid/ciaa248.
 58. Renno, T., Wilson, A., Dunkel, C., Coste, I., Maisnier-Patin, K., et al. (2002) A role for CD147 in thymic development, *J. Immunol.*, **168**, 4946-4950, doi: 10.4049/jimmunol.168.10.4946.
 59. Damsker, J. M., Bukrinsky, M. I., and Constant, S. L. (2007) Preferential chemotaxis of activated human CD4⁺ T cells by extracellular cyclophilin A, *J. Leukoc. Biol.*, **82**, 613-618, doi: 10.1189/jlb.0506317.
 60. Koch, C., Staffler, G., Huttinger, R., Hilgert, I., Prager, E., et al. (1999) T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density, *Int. Immunol.*, **11**, 777-786, doi: 10.1093/intimm/11.5.777.
 61. Kwon, Y., Nukala, S. B., Srivastava, S., Miyamoto, H., Ismail, N. I., et al. (2020) Detection of viral RNA fragments in human iPSC-cardiomyocytes following treatment with extracellular vesicles from SARS-CoV-2 coding-sequence-overexpressing lung epithelial cells, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.05.14.093583.

T LYMPHOCYTES AS TARGETS FOR SARS-CoV-2**Review****E. M. Kuklina**

*Perm Federal Research Center, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
614081 Perm, Russia; e-mail: ibis_07@iegm.ru*

Despite numerous data on the absence or weak expression of the main functional receptor of SARS-CoV-2 angiotensin I-converting enzyme 2 (ACE2) by T cells, recent data demonstrate the ability of a new coronavirus to effectively infect T lymphocytes. The review is devoted to the analysis of these works: it considers alternative (ACE2-independent) pathways of cell infection, identifies T cell subpopulations that serve as the most likely targets of SARS-CoV-2, and discusses the format of virus-cell interaction, including both infectious and non-infectious mechanisms of T lymphocyte regulation, and also evaluates the role of virus-dependent damage of T lymphocytes in the pathogenesis of COVID-19. Particular attention is paid to regulatory T cells as potential targets of SARS-CoV-2, as well as the possible involvement of exosomes in the regulation of sensitivity to the virus of T lymphocytes present in peripheral tissues.

Keywords: SARS-CoV-2, T lymphocytes, ACE2, CD147, Treg

УДК 547.857.7; 577.151.042; 577.152.2

ИНГИБИТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ 7-МЕТИЛГУАНИНА И ЕГО МЕТАБОЛИТА 8-ГИДРОКСИ-7-МЕТИЛГУАНИНА НА ПОЛИ(ADP-РИБОЗО)ПОЛИМЕРАЗУ 1 ЧЕЛОВЕКА

© 2022 Т.А. Кургина^{1#}, С.И. Шрам^{2#}, М.М. Кутузов¹, Т.В. Абрамова¹, Т.А. Щербакова³, Е.А. Мальцева¹, В.В. Поройков⁴, О.И. Лаврик^{1,5}, В.К. Швядас^{6,7}, Д.К. Нилов^{3*}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения РАН, 630090 Новосибирск, Россия

² Институт молекулярной генетики
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
119991 Москва, Россия; электронная почта: nilovdm@gmail.com

⁴ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 Москва, Россия

⁵ Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

⁶ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

⁷ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Научно-исследовательский вычислительный центр, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 22.04.2022

После доработки 23.05.2022

Принята к публикации 23.05.2022

Ранее нами было обнаружено, что образующийся в организме метаболит нуклеиновых кислот 7-метилгуанин (7mGua) способен оказывать ингибиторное действие на фермент поли(ADP-рибозо)-полимеразу 1 (PARP1) – важную фармакологическую мишень в противораковой терапии. В данной работе с использованием оригинального метода анализа активности PARP1, основанного на измерении анизотропии флуоресценции, исследованы ингибиторные свойства 7mGua, а также его метаболита – 8-гидрокси-7-метилгуанина (8h7mGua). Показано, что оба соединения дозозависимо подавляют ферментативную активность PARP1, однако 8h7mGua является более сильным ингибитором. Значения IC_{50} для 8h7mGua при разных концентрациях субстрата NAD^+ оказались в среднем в 4 раза ниже, чем для 7mGua. Более эффективное связывание 8h7mGua в активном центре PARP1 объясняется наличием дополнительной водородной связи с каталитическим остатком Glu988. Экспериментальные и вычислительные исследования не выявили влияния 7mGua и 8h7mGua на активность других ферментов репарации ДНК, что говорит о селективности их ингибиторного действия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: поли(ADP-рибозо)полимераза 1, репарация ДНК, ингибитор, 7-метилгуанин, 8-гидрокси-7-метилгуанин.

DOI: 10.31857/S0320972522060070, **EDN:** AULCZP

ВВЕДЕНИЕ

7-Метилгуанин (7mGua) и 8-гидрокси-7-метилгуанин (8h7mGua, рис. 1) являются метаболитами нуклеиновых кислот и в малом

количестве содержатся в моче человека [1–6]. В матричной РНК метилированию подвержен гуанозин в составе 5'-концевой кэп-структуры. Данная модификация РНК важна для регуляции экспрессии генов и осуществляется

Принятые сокращения: 7mGua – 7-метилгуанин; 8h7mGua – 8-гидрокси-7-метилгуанин; АП-сайт – апуриновый/апиримидиновый сайт; APE1 – апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1; PAR – поли(ADP-рибоза); PARP1 – поли(ADP-рибозо)полимераза 1; Pol β – ДНК-полимераза β ; TDP1 – тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1; TGT – тРНК-гуанин-транскриптаза.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

ферментативно [7–9]. В ДНК гуанозин модифицируется под воздействием различных экзогенных и эндогенных метилирующих агентов, и с возрастом число таких аддуктов увеличивается [10–12]. При этом следует отметить, что свободное основание 7mGua не вовлечено в синтез нуклеотидов и не способно встраиваться в ДНК [13–15]. Некоторое количество 7mGua превращается в 8h7mGua под действием ксантиноксидазы или деметилируется [3, 16, 17]. Так, после внутривенного введения здоровому добровольцу 5 мг 7mGua, меченного изотопом ^{15}N , содержание ^{15}N 7mGua и ^{15}N 8h7mGua в суточной моче составило 48% и 16% от количества введенного вещества соответственно [16].

В процессе компьютерного скрининга ингибиторов поли(ADP-рибозо)полимеразы 1 (PARP1), предпринятого нашей группой, была обнаружена потенциальная способность 7mGua связываться с ферментом и взаимодействовать с ключевыми остатками активного центра Gly863 и Tyr907 [18]. Предварительное исследование подтвердило ингибиторное действие 7mGua в отношении рекомбинантной PARP1 человека [19]. PARP1 активируется в клетке под воздействием различных стрессовых факторов и осуществляет синтез поли(ADP-рибозы) (PAR), используя в качестве субстрата NAD^+ [20–22]. Химиотерапия онкологических заболеваний зачастую основана на применении ДНК-повреждающих агентов. Активация фермента PARP1 на образовавшихся разрывах ДНК и синтезируемый им сигнальный полимер PAR привлекает белки репарации ДНК в область повреждения, что приводит к снижению эффективности действия препаратов [23–26]. В случае патологий сердечно-сосудистой, нервной, иммунной и дыхательной систем также наблюдается активация PARP1, приводящая к истощению запаса NAD^+ и запуску механизмов клеточной гибели [27–29].

Разработка ингибиторов PARP1 является приоритетным направлением в медицинской химии и фармакологии. В последнее время для лечения онкологических заболеваний были одобрены синтетические ингибиторы олапариб, рупапариб и нирапариб [30–32]. К сожалению, широкое использование данных соединений затруднено ввиду вызываемых ими серьезных побочных эффектов, в частности, развития у некоторых пациентов миелодиспластического синдрома [33–35]. Природные соединения, такие как 7mGua и его производные, могут иметь более благоприятный токсикологический профиль по сравнению с синтетическими ингибиторами PARP1, что подтверждается данными QSAR-моделирования свойств 7mGua [18]. Следует отметить, что 7mGua является также известным ингибитором тРНК-гуанинтрансгликозилазы (TGT), катализирующей замену гуанина на кьюин в тРНК [36, 37]. Недавно было показано, что при недостатке TGT существенно снижается пролиферация и миграция опухолевых клеток [38]. Ингибиторное действие 7mGua в отношении нескольких молекулярных мишеней, PARP1 и TGT, может представлять интерес с точки зрения полифармакологии [39, 40].

В представленной работе проведен подробный анализ ингибиторного действия 7mGua и его метаболита 8h7mGua в отношении PARP1 с использованием разработанного ранее метода определения ферментативной активности, основанного на детекции анизотропии флуоресценции [41]. Для доказательства селективности 7mGua и 8h7mGua по отношению к PARP1 было также исследовано их влияние на ферментативную активность ряда других белков репарации ДНК – апуриновую/апириминовую эндонуклеазу 1 (APE1), ДНК-полимеразу β (Pol β) и тирозил-ДНК-фосфодиэстеразу 1 (TDP1).

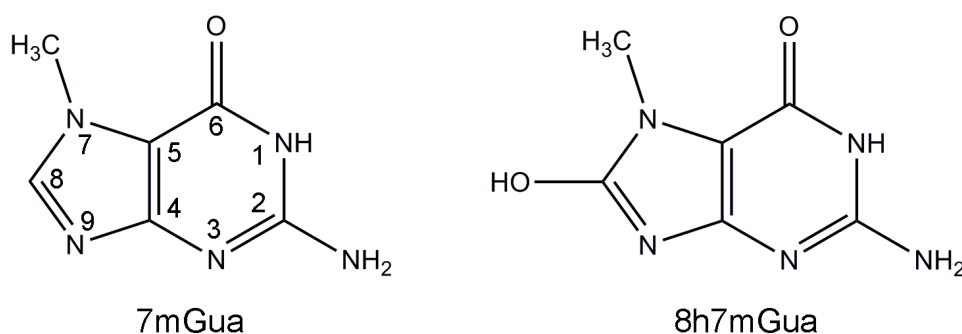


Рис. 1. Химические структуры природных азотистых оснований 7mGua и 8h7mGua

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 7mGua, приобретенный в «Sigma-Aldrich» (США, каталожный номер 67073). Синтез 8h7mGua осуществили согласно схеме, представленной на рис. 2, с использованием ранее опубликованных методик [42, 43]. Более подробное описание дано в Приложении.

Бакуловирус, несущий кДНК PARP1 человека, был любезно предоставлен д-ром В. Шрайбер (École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Франция). Рекombинантный белок PARP1 экспрессировали в суспензионной культуре клеток насекомых Sf9 и выделяли согласно ранее описанной методике [44]. Для активации PARP1 использовали ДНК-дуплекс, образованный олигонуклеотидами 5'-GGAA-GACCCTGACGTTCCCAACTTTATCGCC-FAM-3' (содержит флуорофор FAM на 3'-конце), 5'-GGCGATAAAGTTGGG-3' и 5'-p-AACGTCAGGGTCTTCC-3' (содержит 5'-концевой фосфат). Данный ДНК-дуплекс представляет собой модель поврежденной ДНК.

Для оценки активности PARP1 использовали методику, основанную на измерении анизотропии флуоресценции ДНК [41]. Реакционная смесь содержала буфер (50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM DTT, 5 mM MgCl₂), 100 нМ меченый ДНК-дуплекс, 200 нМ PARP1, а также исследуемое вещество в определенной концентрации. Реакцию иници-

ировали добавлением раствора NAD⁺. Измерение флуоресценции проводили при 25 °C в режиме кинетического анализа на планшетном флуориметре CLARIOstar («BMG Labtech», Германия), длина волны возбуждения составляла 482 нм, эмиссии – 530 нм. Длительность и число циклов определяли индивидуально в зависимости от количества сканируемых лунок. В типичном эксперименте длительность измерения флуоресценции составляла 30–40 мин, интервалы между двумя последовательными измерениями – 30–40 с. Анизотропию рассчитывали по формуле:

$$A = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp}), \quad (1)$$

где $I_{\parallel}$ и $I_{\perp}$ – интенсивность флуоресцентного света, поляризованного в двух взаимно перпендикулярных плоскостях.

Изучение влияния 7mGua и 8h7mGua на активность ферментов репарации APE1, Polβ и TDP1 проводили с использованием ранее опубликованных методик [45–47], более подробное описание дано в Приложении.

Докинг молекул 7mGua и 8h7mGua в активный центр модели PARP1, полученной в предыдущей работе [18], осуществляли с помощью программы Lead Finder 1708 в режиме «extra precision» [48, 49]. Для визуализации полученных структур использовали программу VMD 1.9 [50]. Прогнозирование спектра биологической активности 7mGua и 8h7mGua выполнили с помощью компьютерной про-

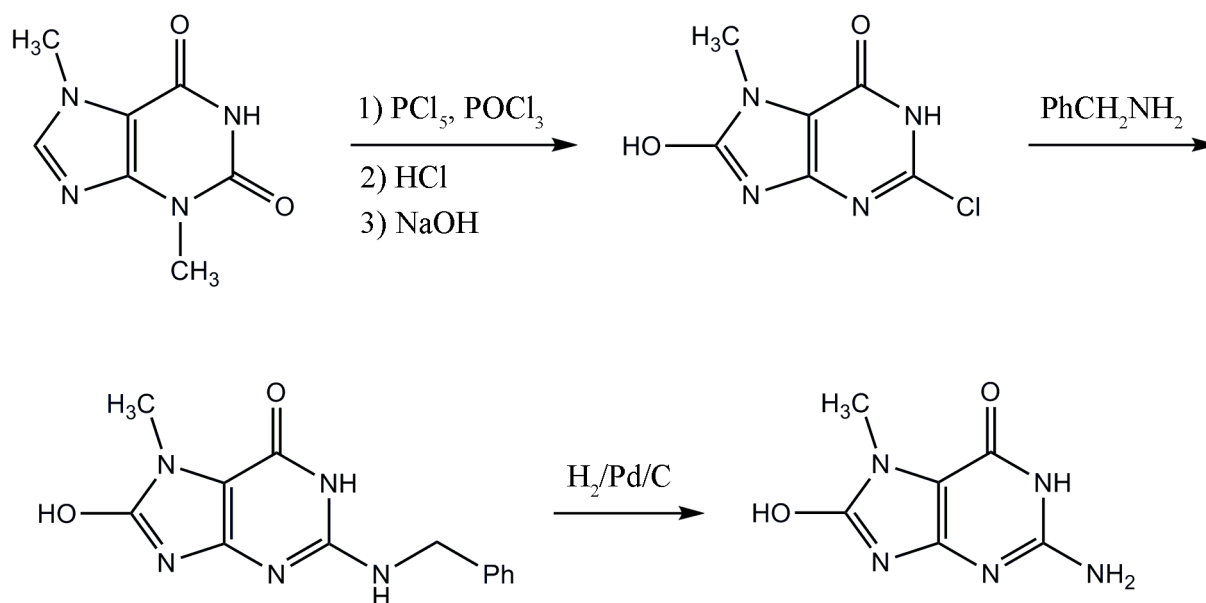


Рис. 2. Схема синтеза 8h7mGua. В качестве исходного соединения использовали теобромин

граммы PASS 2020 [51]. Данная программа способна предсказывать механизм действия органических соединений на основе анализа взаимосвязей «структура-активность» для обучающей выборки, содержащей информацию о структуре и активности более 1,3 млн биологически активных соединений, со средней точностью около 97%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования влияния 7mGua и 8h7mGua на активность PARP1 использовали ранее разработанную тест-систему, в основе которой лежит измерение анизотропии флуоресценции меченого ДНК-дуплекса, с которым связывается PARP1 [41]; при этом в методику были внесены некоторые дополнения, касающиеся алгоритма расчета начальной скорости реакции. Уровень анизотропии отражает размер комплекса, в состав которого включён флуорофор. Анизотропия свободного ДНК-дуплекса минимальна, так как он является небольшой легко вращающейся молекулой. При образовании комплекса PARP1–ДНК наблюдается существенное повышение анизотропии флуоресценции вследствие ограничения подвижности флуорофора. При внесении в реакционную смесь NAD^+ происходит запуск реакции автомодификации PARP1. Наращивание отрицательно заряженного полимера PAR, присоединенного к PARP1, приводит к снижению степени ассоциации PARP1 с ДНК-дуплексом, и следовательно – к постепенному снижению анизотропии (рис. 3).

При расчете начальной скорости реакции делали допущение, что, по крайней мере в начальный период времени, изменение анизотропии линейно зависит от концентрации каталитически активного комплекса PARP1–ДНК, и что диссоциированная форма PARP1 каталитически неактивна. Кинетические данные анизотропия-время аппроксимировались уравнением биэкспоненциально убывающей зависимости:

$$A = A_{\infty} + a \cdot e^{-bt} + c \cdot e^{-dt}, \quad (2)$$

где t – время; a, b, c, d – коэффициенты уравнения; A_{∞} – расчетное значение анизотропии при $t \rightarrow \infty$. Применение более простого уравнения экспоненциально убывающей зависимости давало худший результат (таблица S1 в Приложении).

Полученные коэффициенты a, b, c и d использовали для расчета начальной скорости реакции по формуле:

$$V = R \cdot (a \cdot b + c \cdot d) / (A_0 - A_{\infty}), \quad (3)$$

где A_0 – расчетное значение анизотропии при $t = 0$.

Поскольку $A_0 = A_{\infty} + a + c$, уравнение скорости реакции приобретает вид:

$$V = R \cdot (a \cdot b + c \cdot d) / (a + c), \quad (4)$$

где R – коэффициент для получения значений скорости с классической размерностью М/мин:

$$R = [\text{NAD}^+]_0 \text{ при } [\text{NAD}^+]_0 / [\text{E}] \leq n, \quad (5)$$

$$R = n \cdot [\text{E}] \text{ при } [\text{NAD}^+]_0 / [\text{E}] > n, \quad (6)$$

где $[\text{NAD}^+]_0$ – начальная концентрация NAD^+ , $[\text{E}]$ – концентрация PARP1, n – экспериментально установленное минимальное значение соотношения $[\text{NAD}^+]_0 / [\text{E}]$, при котором достигается полная диссоциация комплекса PARP1–ДНК, что выражается в увеличении $A_0 - A_{\infty}$ (или $a + c$) до максимального значения. Анализ зависимости $(a + c)$ от концентрации NAD^+ при постоянной концентрации PARP1 позволил установить, что среднее значение n равняется 210. По-видимому, это значение соответствует критическому числу остатков ADP-рибозы в молекуле автомодифицированной PARP1, которая полностью утрачивает способность связываться с ДНК-дуплексом.

Для расчета IC_{50} (концентрация ингибитора, при которой начальная скорость реакции снижается на 50%) определяли значения скорости реакции при разных концентрациях потенциального ингибитора, а затем полученные экспериментальные данные аппроксимировали двухпараметрическим уравнением логистической кривой:

$$V_i / V = 1 / (1 + ([I] / \text{IC}_{50})^h), \quad (7)$$

где V_i – начальная скорость реакции в присутствии тестируемого ингибитора, V – скорость реакции без ингибитора; $[I]$ – концентрация ингибитора; h – коэффициент кооперативности.

Оказалось, что 8h7mGua, подобно метаболическому предшественнику 7mGua, оказывает выраженное ингибиторное действие на ферментативную активность PARP1 (рис. 4). Оба соединения дозозависимым образом подавляют активность PARP1 при концентрациях NAD^+ 10–100 мкМ, но при этом 8h7mGua является бо-

лее сильным ингибитором (рис. 4 и рис. S1, S2 в Приложении). Об этом свидетельствуют более низкие значения IC_{50} при всех рассмотренных концентрациях NAD^+ (таблица). Величина IC_{50} 7mGua и 8h7mGua прямо пропорционально

зависит от концентрации субстрата NAD^+ , что указывает на конкурентный характер их действия. Приблизительная концентрация NAD^+ в ядре клетки составляет 100 мкМ [52]. При такой концентрации субстрата полученные нами зна-

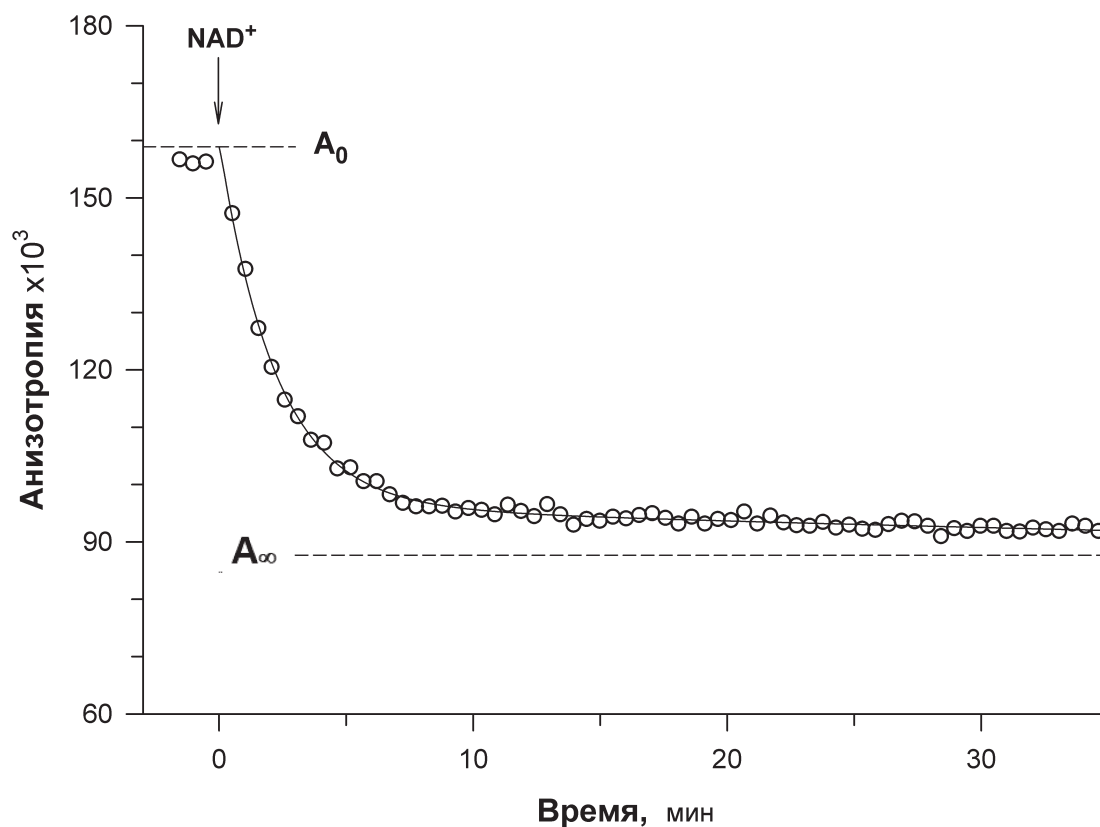


Рис. 3. Анализ скорости реакции, катализируемой PARP1, путем измерения анизотропии флуоресценции

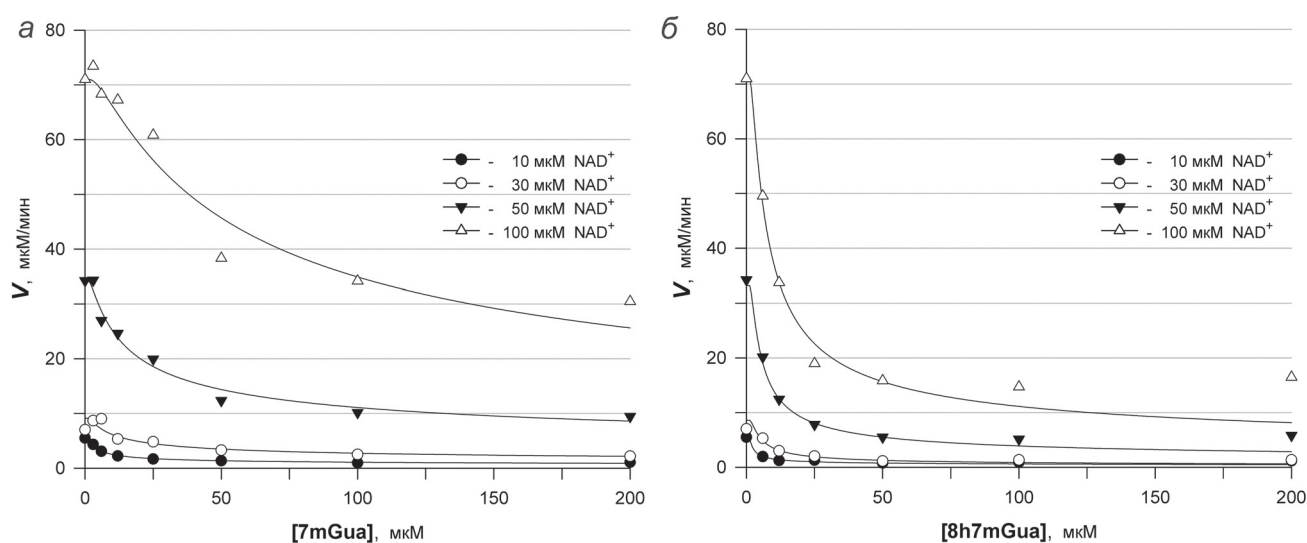


Рис. 4. Влияние 7mGua (а) и 8h7mGua (б) на начальную скорость реакции, катализируемой PARP1, при разных концентрациях субстрата NAD^+

Расчетные значения IC_{50} для ингибиторного действия 7mGua и 8h7mGua в отношении PARP1 при разных концентрациях NAD^+

$[NAD^+]_0$, мкМ	IC_{50} , мкМ	
	7mGua	8h7mGua
10	$8,0 \pm 0,3^*$	$3,6 \pm 0,3$
30	$23,1 \pm 3,1$	$7,3 \pm 0,6$
50	$29,4 \pm 4,2$	$7,6 \pm 0,5$
100	$78,1 \pm 14,1$	$11,0 \pm 1,1$

Примечание. * Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ ошибки среднего.

чения IC_{50} для 7mGua и 8h7mGua составили 78 и 11 мкМ соответственно.

Для выяснения молекулярного механизма действия 7mGua и 8h7mGua были сконструированы модели комплексов с PARP1. В случае 7mGua наблюдали ранее охарактеризованные взаимодействия с остатками активного центра: водородные связи с Gly863 и Ser904, гидрофобный контакт с Ala898 и π -стэкинг с Tyr907 (рис. 5, а) [18, 19]. В случае 8h7mGua наблюдали вышеперечисленные взаимодействия, а также дополнительный контакт с каталитиче-

ским остатком Glu988. Гидроксильная группа 8h7mGua ориентируется в сторону боковой цепи Glu988 и способна формировать водородную связь (рис. 5, б), что может обуславливать более эффективное ингибирование по сравнению с 7mGua.

Способность 7mGua и 8h7mGua ингибировать другие белки репарации ДНК была исследована на примерах APE1, Pol β (ферменты эксцизионной репарации оснований) и TDP1 (фермент, отщепляющий от ДНК 3'-аддукты). APE1 расщепляет сахарофосфатный остов апуринного/апириимидинового (АП) сайта [53, 54]. В качестве субстрата APE1 использовали радиоактивно меченый ДНК-дуплекс длиной 31 н.о., содержащий АП-сайт в положении 12. Продукт расщепления данного субстрата длиной 11 н.о. можно детектировать на электрофореграмме (рис. 6, а). Pol β катализирует удаление 5'-концевого dRP-фрагмента, возникающего в результате расщепления АП-сайта ферментом APE1, и дальнейшее встраивание комплементарного матрице остатка для заполнения образовавшейся брешы [55, 56]. В качестве субстрата Pol β использовали ДНК-дуплекс с расщепленным АП-сайтом, продуктом ре-

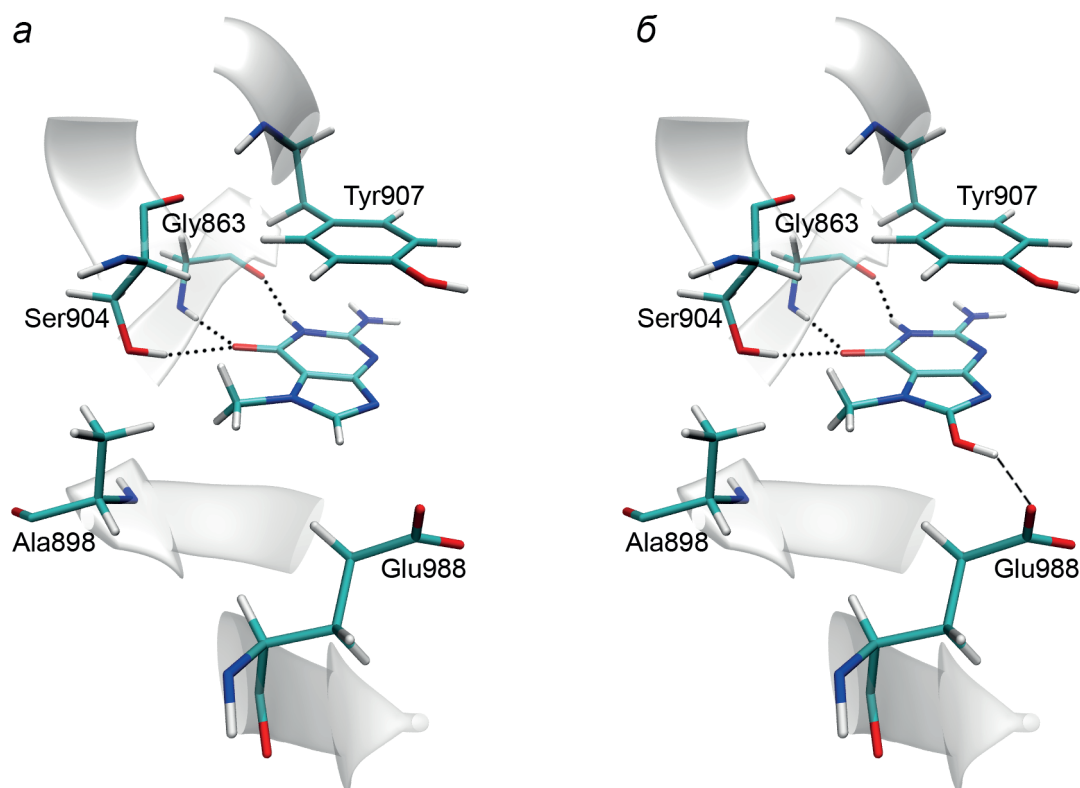


Рис. 5. Позиции ингибиторов 7mGua (а) и 8h7mGua (б) в активном центре PARP1, полученные методом молекулярного докинга. Гидроксильная группа 8h7mGua направлена в сторону боковой цепи Glu988, что делает возможным формирование дополнительной водородной связи

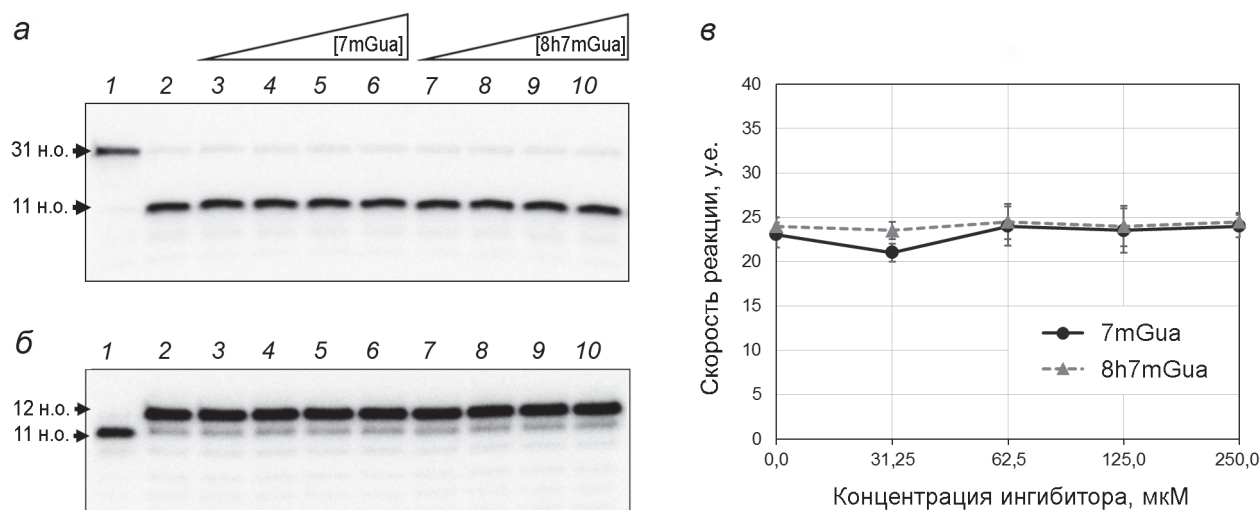


Рис. 6. Проверка влияния 7mGua и 8h7mGua на активность ряда ферментов репарации ДНК. *а* – Электрофореграмма, отражающая активность APE1; 1: ДНК-субстрат (31 н.о.), 2: ДНК+APE1, 3–6: ДНК+APE1+7mGua (33, 75, 150, 300 мкМ), 7–10: ДНК+APE1+8h7mGua (33, 75, 150, 300 мкМ). *б* – Электрофореграмма, отражающая активность Polβ; 1: ДНК-субстрат (11 н.о.), 2: ДНК+Polβ, 3–6: ДНК+Polβ+7mGua (33, 75, 150, 300 мкМ), 7–10: ДНК+Polβ+8h7mGua (3, 75, 150, 300 мкМ). *в* – Активность TDP1 при возрастающей концентрации исследуемых соединений

акции являлся олигонуклеотид длиной 12 н.о. (рис. 6, б). TDP1 отщепляет 3'-аддукты различного происхождения, восстанавливая таким образом структуру ДНК [57, 58]. В качестве субстрата TDP1 использовали олигонуклеотид, содержащий флуорофор на 5'-конце и тушитель флуоресценции на 3'-конце [47]. Отщепление тушителя с помощью TDP1 приводит к возгоранию флуоресценции, которое можно регистрировать в реальном времени (рис. 6, в). В результате было показано отсутствие ингибиторного эффекта 7mGua и 8h7mGua в отношении APE1, Polβ и TDP1 в широком интервале концентраций.

Согласно полученным результатам, 7mGua и 8h7mGua ингибируют PARP1 и не влияют на активность ряда других белков репарации ДНК, что указывает на селективность их действия. Для подкрепления данного вывода было осуществлено предсказание возможной активности 7mGua и 8h7mGua в отношении более широкого набора молекулярных мишеней с помощью программы PASS. В результате анализа списка видов активности, для которых оценка вероятности P_a составила более 0,6, не было обнаружено APE1, Polβ, TDP1 и других белков репарации ДНК. В то же время предсказывается наличие активности в отношении TGT – известной дополнительной мишени 7mGua ($P_a = 0,685$; вопрос ингибирования TGT более подробно рассмотрен во Введении), а также некоторых ферментов метаболизма бактерий.

Таким образом, использование методики, основанной на измерении анизотропии флуоресценции, позволило охарактеризовать и сравнить ингибиторные свойства 7mGua и его метаболита 8h7mGua в отношении рекомбинантной PARP1 человека. Показано, что оба соединения подавляют активность PARP1, но при этом 8h7mGua обладает более выраженным ингибиторным эффектом. Это обусловлено дополнительным взаимодействием 8h7mGua с каталитическим остатком Glu988. Также показано отсутствие влияния 7mGua и 8h7mGua на активность других ферментов системы репарации ДНК (APE1, Polβ, TDP1), что свидетельствует о селективности их действия. Поскольку PARP1 является доказанной терапевтической мишенью для лечения различных заболеваний, подавление ее активности с помощью природных соединений 7mGua и 8h7mGua может представлять значительный интерес. В дальнейших экспериментах *in vitro* и *in vivo* следует учитывать, что молекула 7mGua обладает свойствами пролекарства, превращаясь в организме в более активный метаболит – 8h7mGua.

Вклад авторов. Д.К. Нилов – концепция и руководство работой; Т.А. Кургина, С.И. Шрам, М.М. Кутузов, Т.В. Абрамова, Т.А. Щербакова, Е.А. Мальцева, В.В. Поройков и Д.К. Нилов – проведение экспери-

ментов; Т.А. Кургина, С.И. Шрам, Т.В. Абрамова и Д.К. Нилов — написание текста; О.И. Лаврик и В.К. Швядас — обсуждение результатов исследования и редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-74-10072) за исключением указанных далее работ. Выделение и очистка ферментов APE1 и Pol β выполнены при поддержке РФФИ (грант № 20-34-90095). Компьютерное прогнозирование биологической активности выполнено в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122030100170-5).

Конфликт интересов. Д.К. Нилов и В.К. Швядас являются авторами патента на использование 7mGua для подавления ферментативной активности PARP1. Д.К. Нилов, С.И. Шрам, Т.А. Щербакова и В.К. Швядас являются авторами патентной заявки на использование 8h7mGua для подавления ферментативной активности PARP1.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Weissmann, B., Bromberg, P. A., and Gutman, A. B. (1957) The purine bases of human urine. I. Separation and identification, *J. Biol. Chem.*, **224**, 407-422.
- Weissmann, B., Bromberg, P. A., and Gutman, A. B. (1957) The purine bases of human urine. II. Semiquantitative estimation and isotope incorporation, *J. Biol. Chem.*, **224**, 423-434.
- Weissmann, B., and Gutman, A. B. (1957) The identification of 6-succinoaminopurine and of 8-hydroxy-7-methylguanine as normal human urinary constituents, *J. Biol. Chem.*, **229**, 239-250.
- Svoboda, P., and Kasai, H. (2004) Simultaneous HPLC analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine and 7-methylguanine in urine from humans and rodents, *Anal. Biochem.*, **334**, 239-250.
- Rodríguez-Gonzalo, E., Hernández-Prieto, R., García-Gómez, D., and Carabias-Martínez, R. (2013) Capillary electrophoresis-mass spectrometry for direct determination of urinary modified nucleosides. Evaluation of synthetic urine as a surrogate matrix for quantitative analysis, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **942-943**, 21-30.
- Račkowska, E., Bobrowska-Korczak, B., and Giebułtowicz, J. (2019) Development and validation of a rapid LC-MS/MS method for determination of methylated nucleosides and nucleobases in urine, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1128**, 121775.
- Shuman, S. (2002) What messenger RNA capping tells us about eukaryotic evolution, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 619-625.
- Shafer, B., Chu, C., and Shatkin, A. J. (2005) Human mRNA cap methyltransferase: Alternative nuclear localization signal motifs ensure nuclear localization required for viability, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 2644-2649.
- Topisirovic, I., Svitkin, Y. V., Sonenberg, N., and Shatkin, A. J. (2011) Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **2**, 277-298.
- Park, J. W., and Ames, B. N. (1988) 7-Methylguanine adducts in DNA are normally present at high levels and increase on aging: Analysis by HPLC with electrochemical detection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7467-7470.
- Mustonen, R., and Hemminki, K. (1992) 7-Methylguanine levels in DNA of smokers' and non-smokers' total white blood cells, granulocytes and lymphocytes, *Carcinogenesis*, **13**, 1951-1955.
- Tamae, K., Kawai, K., Yamasaki, S., Kawanami, K., Ikeda, M., et al. (2009) Effect of age, smoking and other lifestyle factors on urinary 7-methylguanine and 8-hydroxydeoxyguanosine, *Cancer Sci.*, **100**, 715-721.
- Craddock, V. M., Mattocks, A. R., and Magee, P. N. (1968) The fate of 7[¹⁴C]-methylguanine after administration to the rat, *Biochem. J.*, **109**, 75-78.
- Kaina, B., Heindorff, K., and Aurich, O. (1983) O⁶-methylguanine, but not N7-methylguanine or N3-methyladenine, induces gene mutations, sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in Chinese hamster cells, *Mutat. Res.*, **108**, 279-292.
- Kerr, S. J. (1990) Methylated oxypurines and induction of differentiation of murine erythroleukemia cells, *Mol. Cell. Biochem.*, **92**, 37-44.
- Litwack, M. D., and Weissmann, B. (1966) Source of urinary 8-hydroxy-7-methylguanine in man, *Biochemistry*, **5**, 3007-3012.
- Skupp, S., and Ayzavian, J. H. (1969) Oxidation of 7-methylguanine by human xanthine oxidase, *J. Lab. Clin. Med.*, **73**, 909-916.
- Нилов Д.К., Тараров В.И., Куликов А.В., Захаренко А.Л., Гущина И.В., и др. (2016) Ингибирование поли(ADP-рибозо)полимеразы метаболитом

- нуклеиновых кислот 7-метилгуанином, *Acta Naturae*, **8**, 120-128.
19. Nilov, D., Maluchenko, N., Kurgina, T., Pushkarev, S., Lys, A., et al. (2020) Molecular mechanisms of PARP-1 inhibitor 7-methylguanine, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2159.
 20. Шиловский Г. А., Хохлов А. Н., Шрам С. И. (2013) Система поли(ADP-рибозил)ирования белков: роль в поддержании стабильности генома и детерминации продолжительности жизни, *Биохимия*, **78**, 473-487.
 21. Alemasova, E. E., and Lavrik, O. I. (2019) Poly(ADP-ribose)ylation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 3811-3827.
 22. Нилов Д. К., Пушкарев С. В., Гущина И. В., Манасарян Г. А., Кирсанов К. И., и др. (2020) Моделирование фермент-субстратных комплексов поли(ADP-рибозо)полимеразы 1 человека, *Биохимия*, **85**, 116-125.
 23. Cepeda, V., Fuertes, M. A., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C., et al. (2006) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors in cancer chemotherapy, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **1**, 39-53.
 24. Martin, S. A., Lord, C. J., and Ashworth, A. (2008) DNA repair deficiency as a therapeutic target in cancer, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **18**, 80-86.
 25. Efremova, A. S., Zakharenko, A. L., Shram, S. I., Kulikova, I. V., Drenichev, M. S., et al. (2013) Disaccharide pyrimidine nucleosides and their derivatives: a novel group of cell-penetrating inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase 1, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **32**, 510-528.
 26. Lord, C. J., Tutt, A. N., and Ashworth, A. (2015) Synthetic lethality and cancer therapy: Lessons learned from the development of PARP inhibitors, *Annu. Rev. Med.*, **66**, 455-470.
 27. Curtin, N. J., and Szabo, C. (2013) Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond, *Mol. Aspects Med.*, **34**, 1217-1256.
 28. Henning, R. J., Bourgeois, M., and Harbison, R. D. (2018) Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and PARP inhibitors: Mechanisms of action and role in cardiovascular disorders, *Cardiovasc. Toxicol.*, **18**, 493-506.
 29. Berger, N. A., Besson, V. C., Boulares, A. H., Bürkle, A., Chiarugi, A., et al. (2018) Opportunities for the repurposing of PARP inhibitors for the therapy of non-oncological diseases, *Br. J. Pharmacol.*, **175**, 192-222.
 30. Frampton, J. E. (2015) Olaparib: A review of its use as maintenance therapy in patients with ovarian cancer, *BioDrugs*, **29**, 143-150.
 31. Mittica, G., Ghisoni, E., Giannone, G., Genta, S., Aglietta, M., et al. (2018) PARP inhibitors in ovarian cancer, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **13**, 392-410.
 32. Zimmer, A. S., Gillard, M., Lipkowitz, S., and Lee, J. M. (2018) Update on PARP inhibitors in breast cancer, *Curr. Treat. Options Oncol.*, **19**, 21.
 33. Ohmoto, A., and Yachida, S. (2017) Current status of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors and future directions, *Onco Targets Ther.*, **10**, 5195-5208.
 34. Walsh, C. (2018) Targeted therapy for ovarian cancer: the rapidly evolving landscape of PARP inhibitor use, *Minerva Ginecol.*, **70**, 150-170.
 35. Jain, P. G., and Patel, B. D. (2019) Medicinal chemistry approaches of poly ADP-Ribose polymerase 1 (PARP1) inhibitors as anticancer agents – A recent update, *Eur. J. Med. Chem.*, **165**, 198-215.
 36. Farkas, W. R., Jacobson, K. B., and Katze, J. R. (1984) Substrate and inhibitor specificity of tRNA-guanine ribosyltransferase, *Biochim. Biophys. Acta*, **781**, 64-75.
 37. Johannsson, S., Neumann, P., and Ficner, R. (2018) Crystal structure of the human tRNA guanine transglycosylase catalytic subunit QTRT1, *Biomolecules*, **8**, 81.
 38. Zhang, J., Lu, R., Zhang, Y., Matuszek, Z., Zhang, W., et al. (2020) tRNA Queuosine modification enzyme modulates the growth and microbiome recruitment to breast tumors, *Cancers (Basel)*, **12**, 628.
 39. Bolognesi, M. L. (2013) Polypharmacology in a single drug: multitarget drugs, *Curr. Med. Chem.*, **20**, 1639-1645.
 40. Medina-Franco, J. L., Giulianotti, M. A., Welmaker, G. S., and Houghten, R. A. (2013) Shifting from the single to the multitarget paradigm in drug discovery, *Drug Discov. Today*, **18**, 495-501.
 41. Kurgina, T. A., Anarbaev, R. O., Sukhanova, M. V., and Lavrik, O. I. (2018) A rapid fluorescent method for the real-time measurement of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity, *Anal. Biochem.*, **545**, 91-97.
 42. Borowitz, I. J., Bloom, S. M., Rothschild, J., and Sprinson, D. B. (1965) Methylated purines and pyrimidines. I. Syntheses of 8-hydroxy-7-methylguanine and methylation of a 5-(benzylideneamino) pyrimidine, *Biochemistry*, **4**, 650-655.
 43. Fischer, E. (1895) Verwandlung des Theobromins in Methylirte Harnsäuren, *Chem. Ber.*, **28**, 2480-2495.
 44. Amé, J. C., Kalisch, T., Dantzer, F., and Schreiber, V. (2011) Purification of recombinant poly(ADP-ribose) polymerases, *Methods Mol. Biol.*, **780**, 135-152.
 45. Ilna, E. S., Khodyreva, S. N., and Lavrik, O. I. (2018) Unusual interaction of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1) with abasic sites via the Schiff-base-dependent mechanism, *Biochimie*, **150**, 88-99.
 46. Belousova, E. A., Vasil'eva, I. A., Moor, N. A., Zatsepin, T. S., Oretskaya, T. S., et al. (2013) Clustered DNA lesions containing 5-formyluracil and AP site: Repair via the BER system, *PLoS One*, **8**, e68576.
 47. Zakharenko, A., Khomenko, T., Zhukova, S., Koval, O., Zakharova, O., et al. (2015) Synthesis and biological evaluation of novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors with a benzopentathiepine moiety, *Bioorg. Med. Chem.*, **23**, 2044-2052.
 48. Stroganov, O. V., Novikov, F. N., Stroylov, V. S., Kulkov, V., et al. (2008) Lead finder: an approach to improve accuracy of protein-ligand docking, binding energy estimation, and virtual screening, *J. Chem. Inf. Model.*, **48**, 2371-2385.
 49. Novikov, F. N., Stroylov, V. S., Zeifman, A. A., Stroganov, O. V., Kulkov, V., et al. (2012) Lead Finder docking and virtual screening evaluation with Astex and DUD test sets, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **26**, 725-735.

50. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: Visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.*, **14**, 33-38.
51. Филимонов Д. А., Дружиловский Д. С., Лагунин А. А., Глориозова Т. А., Рудик А. В., и др. (2018) Компьютерное прогнозирование спектров биологической активности химических соединений: возможности и ограничения, *Biomed. Chem. Res. Methods*, **1**, e00004.
52. Koch-Nolte, F., Fischer, S., Haag, F., and Ziegler, M. (2011) Compartmentation of NAD⁺-dependent signaling, *FEBS Lett.*, **585**, 1651-1656.
53. Demple, B., Herman, T., and Chen, D. S. (1991) Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: Definition of a family of DNA repair enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 11450-11454.
54. Халиуллин И. Г., Нилов Д. К., Шаповалова И. В., Шведас В. К. (2012) Построение механистической полноатомной модели апуриновой/апиридиновой эндонуклеазы человека APE1 для виртуального скрининга новых ингибиторов, *Acta Naturae*, **4**, 83-89.
55. Matsumoto, Y., and Kim, K. (1995) Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair, *Science*, **269**, 699-702.
56. Beard, W. A., and Wilson, S. H. (2006) Structure and mechanism of DNA polymerase Beta, *Chem. Rev.*, **106**, 361-382.
57. Pouliot, J. J., Robertson, C. A., and Nash, H. A. (2001) Pathways for repair of topoisomerase I covalent complexes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genes Cells*, **6**, 677-687.
58. Гущина И. В., Нилов Д. К., Захаренко А. Л., Лаврик О. И., Шведас В. К. (2017) Моделирование структуры и скрининг ингибиторов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 человека, *Acta Naturae*, **9**, 62-69.

INHIBITORY EFFECTS OF 7-METHYLGUANINE AND ITS METABOLITE 8-HYDROXY-7-METHYLGUANINE ON HUMAN POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE 1

T. A. Kurgina^{1#}, S. I. Shram^{2#}, M. M. Kutuzov¹, T. V. Abramova¹, T. A. Shcherbakova³,
E. A. Maltseva¹, V. V. Poroikov⁴, O. I. Lavrik^{1,5}, V. K. Švedas^{6,7}, and D. K. Nilov^{3*}

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, 630090 Novosibirsk, Russia

² Institute of Molecular Genetics, National Research Centre "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physicochemical Biology, 119991 Moscow, Russia; e-mail: nilovdm@gmail.com

⁴ Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Moscow, Russia

⁵ Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia

⁶ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119991 Moscow, Russia

⁷ Lomonosov Moscow State University, Research Computing Center, 119991 Moscow, Russia

Previously, we have found that a nucleic acid metabolite 7-methylguanine (7mGua) produced in the body can have an inhibitory effect on the poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) enzyme, an important pharmacological target in anticancer therapy. In this work, using an original method of analysis of PARP1 activity based on the measurement of fluorescence anisotropy, we studied the inhibitory properties of 7mGua and its metabolite, 8-hydroxy-7-methylguanine (8h7mGua). Both compounds dose-dependently inhibited the PARP1 enzymatic activity, however, 8h7mGua was shown to be a stronger inhibitor. The IC₅₀ values for 8h7mGua at different concentrations of the NAD⁺ substrate were found to be 4 times lower, on average, than those for 7mGua. The more efficient binding of 8h7mGua in the PARP1 active site is explained by the presence of an additional hydrogen bond with the Glu988 catalytic residue. Experimental and computational studies did not reveal the effect of 7mGua and 8h7mGua on the activity of other DNA repair enzymes, indicating the selectivity of their inhibitory action.

Keywords: poly(ADP-ribose) polymerase, DNA repair, inhibitor, 7-methylguanine, 8-hydroxy-7-methylguanine

УДК 571.27; 612.112.3.0.062; 612.112.91

УЧАСТИЕ МАРК И PI3K В РЕГУЛЯЦИИ СЕКРЕЦИИ ЦИТОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ОТВЕТ НА КОМБИНАЦИЮ ЛПС *Escherichia coli* и rDer p 2

© 2022 А.А. Морозова^{1,2*}, Н.И. Косякова¹, И.Р. Прохоренко²

¹ Федеральное государственное автономное учреждение здравоохранения
Больница Пущинского научного центра Российской академии наук,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: honorikudi@mail.ru

² Институт фундаментальных проблем биологии — обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр
«Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»,
142290 Пущино, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 10.11.2021

После доработки 15.05.2022

Принята к публикации 18.05.2022

Поиск эффективных подходов к терапии острых воспалений, вызванных сочетанием аллергенов и инфекционных агентов, является важной задачей мирового здравоохранения. Клещи домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* — источник аллергенов групп Der p и переносчик бактериальных соединений, в частности, липополисахаридов (ЛПС). ЛПС и Der p 2 вызывают секрецию провоспалительных цитокинов с участием киназ p38 MAPK, MEK 1/2 и PI3K. Участие указанных киназ в регуляции ответа клеток на комбинацию ЛПС и Der p 2 недостаточно исследовано. Мы оценивали влияние ингибирования киназ (p38 MAPK, MEK 1/2 и PI3K) на синтез цитокинов (ФНО, ИЛ-8 и ИЛ-6) при активации моноклеарных клеток периферической крови (РВМС) здоровых добровольцев ЛПС *E. coli* и rDer p 2. Нами была выявлена зависимость вклада киназ в регуляцию ответа клеток от природы агента (rDer p 2 и/или ЛПС). Мы обнаружили, что p38 MAPK играет ключевую роль в синтезе ФНО РВМС в ответ на комбинацию ЛПС и rDer p 2. MEK 1/2-зависимый сигнальный путь является основным для синтеза ФНО и ИЛ-8 в ответ на ЛПС и rDer p 2. PI3K-зависимая передача сигналов негативно регулирует продукцию ФНО во время активации клеток rDer p 2, но не участвует в ответе на комбинацию ЛПС и rDer p 2. PI3K-зависимая передача сигналов в регуляции синтеза цитокинов РВМС наиболее выражена в ответ на их активацию rDer p 2. Понимание особенностей ответов иммунных клеток на комбинации воспалительных агентов облегчит поиск новых внутриклеточных мишеней в противовоспалительной терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: РВМС, p38 MAPK, MEK 1/2, PI3K, Der p 2, липополисахариды, цитокины.

DOI: 10.31857/S0320972522060082, **EDN:** AUROHZ

ВВЕДЕНИЕ

Клещи домашней пыли являются одним из наиболее распространённых источников аллергенов. В ряде регионов аллергены клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* приводят к возникновению ~50% зарегистрированных случаев аллергической астмы [1].

D. pteronyssinus являются источником более двух десятков белков с аллергическими свойствами, различающихся по механизму действия. Основными группами белков-аллергенов клещей являются протеазы и липид-связывающие белки, которые могут облегчать перенос провоспалительных агентов микробной природы к иммунным клеткам [2]. Аллергены с протео-

Принятые сокращения: ИЛ — интерлейкин; ЛПС — липополисахарид; ФНО — фактор некроза опухолей; MAPK — митоген-активируемая протеинкиназа; MD-2 — фактор миелоидной дифференцировки 2; MEK1/2 — киназа митоген-активируемой протеинкиназы двойной специфичности 1/2; MyD88 — фактор миелоидной дифференцировки 88; РВМС — моноклеарные клетки периферической крови; PI3K — фосфоинозитид-3-киназа; rDer p 2 — рекомбинантный белок-аллерген из клеща *Dermatophagoides pteronyssinus*; TLR — толл-подобный рецептор.

* Адресат для корреспонденции.

литической активностью вызывают воспаление путём двух механизмов. Первый механизм — протеолитическое нарушение целостности эпителиального барьера альвеол, приводящее к усилению сенсибилизации другими аллергенами. Второй механизм — непротеолитическая активация провоспалительного ответа клеток [3]. Домашняя пыль, естественная среда обитания указанных клещей, содержит большое количество грибов и бактерий, являющихся источником β -глюканов и липополисахаридов (ЛПС) соответственно. Указанные соединения способны активировать врожденную иммунную систему. Их активность может быть усилена за счёт переноса белками-аллергенами [4–6]. Одним из ключевых аллергенов из *D. pteronyssinus* является белок Der p 2 [7].

Классическим механизмом сенсибилизации к аллергенам из *D. pteronyssinus* является избыточная активация $CD4^+$ Th2-лимфоцитов, секретирующих ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13. Указанные цитокины активируют синтез IgE, запускают воспалительные ответы эозинофилов, нейтрофилов и макрофагов в лёгких [8]. Аллергены из *D. pteronyssinus*, кроме Th2-зависимого ответа, могут вызывать TLR2/4-зависимый (толл-подобный рецептор, TLR) воспалительный ответ альвеолярных макрофагов [9].

Активация иммунных клеток белком Der p 2 может происходить по TLR4-зависимому и TLR4-независимому механизмам [7, 10]. К TLR4-независимой активации можно отнести Th2-зависимый клеточный ответ на Der p 2, описанный выше [10]. В качестве альтернативных мишеней могут выступать TLR2 и другие молекулы [11]. TLR4-зависимый механизм реализуется за счёт того, что аллерген клеща *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 2) является миметиком корцептора TLR4, фактора миелоидной дифференцировки 2 (MD-2) [5, 12–14]. Der p 2 способен активировать передачу сигнала внутрь клетки в отсутствие ЛПС, а также усиливать ЛПС-индуцированные TLR4-зависимые ответы [15]. Der p 2 также способен активировать экспрессию MD-2 в мононуклеарных клетках периферической крови (РВМС), тем самым усиливая провоспалительные эффекты ЛПС [13]. Благодаря функциональной гомологии с MD-2, Der p 2 обеспечивает ЛПС-опосредованную активацию TLR4 в отсутствие MD-2 и облегчает ее в присутствии MD-2. Помимо активации врожденного иммунитета, Der p 2 взаимодействует с В-лимфоцитами, вовлекая в ответ адаптивный иммунитет [14]. В литературе

описана способность аллергена Der p 2 активировать фосфорилирование киназ p38 MAPK, MEK1/2 и PI3K в клетках легких и иммунных клетках человека [14, 16–19]. Активация дальнейших сигнальных событий приводит к синтезу и высвобождению клетками про- и противовоспалительных цитокинов ФНО, ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, CXCL10 и других [14, 19]. ЛПС также вызывает передачу сигнала по сигнальным путям PI3K/Akt, ERK, JNK и p38 MAPK, регулирующих секрецию провоспалительных цитокинов ФНО, ИЛ-1 β и ИЛ-6 [20, 21].

Как было сказано выше, аллергены домашней пыли могут включать в себя не только белки самих клещей, но и микробные продукты, модулирующие воспалительный процесс. Таким образом, для обеспечения адекватных подходов к терапии аллергии на домашнюю пыль необходимо исследовать совместные эффекты аллергена Der p 2 и микробных агентов, в частности, ЛПС, на активацию иммунных клеток. Кроме того, существует проблема возникновения инфекции на фоне аллергического воспаления, например, при бронхиальной астме [21]. Понимание особенностей действия агентов аллергической природы и соединений бактериальной природы позволит эффективнее купировать последствия аллергических патологий, совмещённых с инфекционными процессами. Ранее мы обнаружили явление усиления ЛПС-индуцированной секреции цитокинов клетками крови человека в присутствии аллергенов из *D. pteronyssinus* [22]. Мы предположили, что при ответе иммунных клеток на комбинацию агентов возможно изменение вкладов внутриклеточных сигнальных молекул, например, киназ p38 MAPK, MEK1/2 и PI3K. При анализе литературы мы не нашли работ, посвященных исследованию вклада киназ в совместную активацию изолированных иммунных клеток ЛПС и Der p 2.

Исходя из вышесказанного, целью настоящей работы была оценка вклада ключевых киназ p38 MAPK, MEK1/2 и PI3K в ответ мононуклеарных клеток периферической крови человека на комбинацию аллергена клещей домашней пыли Der p 2 и ЛПС. Воспалительные реакции на ЛПС, в том числе «цитокиновый шторм», начинаются в течение первых 24 ч [23], поэтому настоящее исследование было сосредоточено на относительно быстрых клеточных ответах на аллерген и/или ЛПС в течение первых 16 ч активации. Полученные результаты в будущем позволят выявить возможные общие

точки блокирования воспаления, вызванного сочетанием аллергенов и микробных агентов. Мы исследовали вклад р38 MAPK, MEK1/2 и PI3K в активацию синтеза провоспалительных цитокинов ФНО, ИЛ-6 и ИЛ-8 РВМС, индуцированного ЛПС из *Escherichia coli* O55:B5, рекомбинантным белком rDer p 2 и их комбинацией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В исследовании были использованы S-гликоформа ЛПС *E. coli* O55:B5 («Sigma-Aldrich», США); рекомбинантный белок-аллерген клеща домашней пыли *D. pteronyssinus* rDer p 2, полученный в дрожжевой культуре с целью исключения загрязнения образца ЛПС («MyBioSource», США); среда RPMI 1640 (25 mM HEPES, NaHCO₃, L-глутамин) («Sigma-Aldrich»), SB 203580 ингибитор р38 MAPK («Sigma-Aldrich»), PD 098059 ингибитор MAPKK (MEK1 и MEK2) («Sigma-Aldrich»), ингибитор PI3K вортманнин («Sigma-Aldrich»), иммуноферментные тест-системы для определения ИЛ-6, ФНО, ИЛ-8 (АО «ВЕКТОР-БЕСТ», РФ).

Изоляция РВМС. Эксперименты выполняли на венозной крови 10 условно здоровых добровольцев (3 женщины, 7 мужчин, возраст 18–30 лет). Протокол исследования соответствовал Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и был одобрен Локальным этическим комитетом Больницы научного центра Пущино (№ 2 от 10.04.2014). Все добровольцы дали письменное согласие на участие в исследовании после того, как были проинформированы о всех предстоящих процедурах. Всем добровольцам перед исследованием выполнялось тестирование на наличие аллергии к домашней пыли. Критерии включения в экспериментальную группу соответствовали требованиям к сдаче крови: отсутствие врожденных нарушений, отсутствие инфекционных заболеваний и контактов с инфицированными больными не менее двух месяцев, отсутствие кожной реакции на аллергены домашней пыли.

РВМС изолировали из венозной крови на градиенте плотности перколла (1,077 г/мл) согласно работе Haslett et al. [24]. Забор венозной крови условно здоровых добровольцев выполнялся сотрудниками Больницы Пущинского научного центра РАН. В качестве антикоагулянта использовали 5%-ный гепарин натрия. Цель-

ную кровь центрифугировали 2 мин при 300 g и удаляли супернатант. Для осаждения эритроцитов к клеткам добавляли 20 мл 6%-ного декстрана (500 кДа) в фосфатно-солевом буфере, перемешивали и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. После осаждения эритроцитов плазму крови отбирали и центрифугировали 6 мин при 275 g для удаления тромбоцитов. Плазму, освобожденную от тромбоцитов, разводили в фосфатно-солевом буфере в соотношении 1 : 4. Ресуспендировали клетки в 8 мл полученной смеси, наслаивали на 3 мл перколла (1,077 г/мл) и центрифугировали 15 мин при 300 g. Фракция РВМС остается на градиенте плотности. Отбирали РВМС, трижды промывали их фосфатно-солевым буфером и центрифугировали 5 мин при 300 g. Клетки окрашивали трипановым синим и определяли жизнеспособность с помощью автоматического счетчика Countess® Automated Cell Counter («Invitrogen», США). Жизнеспособность составляла не менее 90%. РВМС разводили RPMI-1640 до 1×10^6 клеток/мл и разносили в 48-луночные планшеты. Инкубацию клеток с исследуемыми агентами выполняли в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °C и концентрации CO₂ 5%. Статистически значимых изменений жизнеспособности РВМС после стимуляции 40 нг/мл ЛПС и 0,5 мкг/мл rDer p 2 мы не обнаружили.

Активация РВМС человека к продукции цитокинов. РВМС (10^6 клеток/мл в каждом образце) инкубировали 1 ч с ингибиторами SB 203580 (10 мкМ), PD 098059 (50 мкМ), вортманнин (100 нМ) в CO₂-инкубаторе («Jouan», Франция) при температуре 37 °C и концентрации CO₂ 5%. В контрольные пробы добавляли соответствующее количество стерильного фосфатно-солевого буфера. После инкубации с ингибиторами в соответствующие образцы добавляли ЛПС *E. coli* (40 нг/мл) и/или rDer p 2 (0,5–3 мкг/мл) и инкубировали в течение 6 и 16 ч в CO₂-инкубаторе. Далее клетки осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин. Полученные супернатанты отбирали и хранили при –20 °C до определения содержания цитокинов. После 6 ч инкубации оценивали концентрации ФНО, после инкубации 16 ч – ИЛ-6 и ИЛ-8. Концентрации ЛПС были выбраны на основе литературных данных [25, 26]. Концентрация rDer p 2 была подобрана по данным литературы [14, 27] и результатам предварительных экспериментов (рис. 1). Время инкубации для каждого цитокина было выбрано на основе литературных данных для РВМС человека [17, 27].

Определение содержания цитокинов. Определение концентрации цитокинов в образцах проводили с помощью иммуноферментных наборов по методике, предложенной производителем. Оптическую плотность регистрировали с помощью иммуноферментного анализатора STAT FAX 3200 («Awareness Technology, Inc», США) при длине волны 450 нм. Количественную оценку результатов проводили с использованием калибровочной кривой, отражающей зависимость оптической плотности образца от концентрации цитокина.

Статистическая обработка. Полученные результаты обрабатывали с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010 (настройка AtteStat) и SigmaPlot 12.5 («Systas Software», США). Гипотезу о нормальности распределения оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Выборочные распределения отличались от нормального распределения, поэтому мы применили методы

непараметрической статистики. Экспериментальные данные представляли в виде медиан и перцентилей 10, 25, 75 и 90%. Статистическую значимость различий выборочных медианных значений оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

rDer p 2 дозозависимо активирует секрецию ФНО РВМС. rDer p 2 в концентрации 0,5 мкг/мл и выше вызывал увеличение секреции ФНО РВМС человека (рис. 1).

Увеличение концентрации rDer p 2 вызывало увеличение секреции ФНО РВМС человека. Мы ожидали синергический эффект между rDer p 2 и ЛПС, но не обнаружили его. Тем не менее это не исключает различия вкладов разных сигнальных путей в ответ клеток на эти стимулы. В дальнейшем мы исследовали

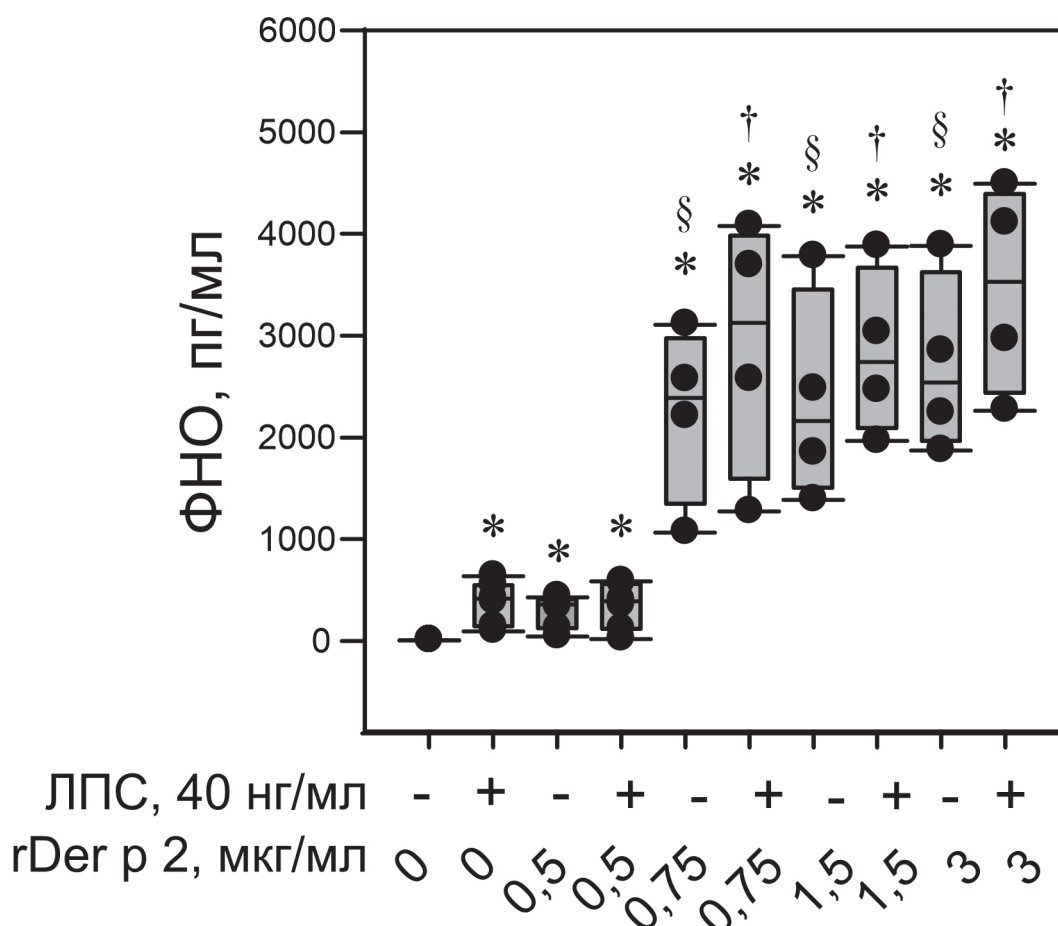


Рис. 1. Концентрации ФНО, высвобождаемого РВМС человека в ответ на ЛПС, rDer p 2 или их комбинацию после 6 ч инкубации ($n = 4$). Данные представлены в виде медиан и перцентилей 10, 25, 75 и 90%. * $p < 0,05$ – статистически достоверное различие с контролем, § $< 0,05$ – статистически достоверное различие с действием 0,5 мкг/мл rDer p 2, † $< 0,05$ – статистически достоверное различие с действием комбинации 0,5 мкг/мл и 40 нг/мл ЛПС

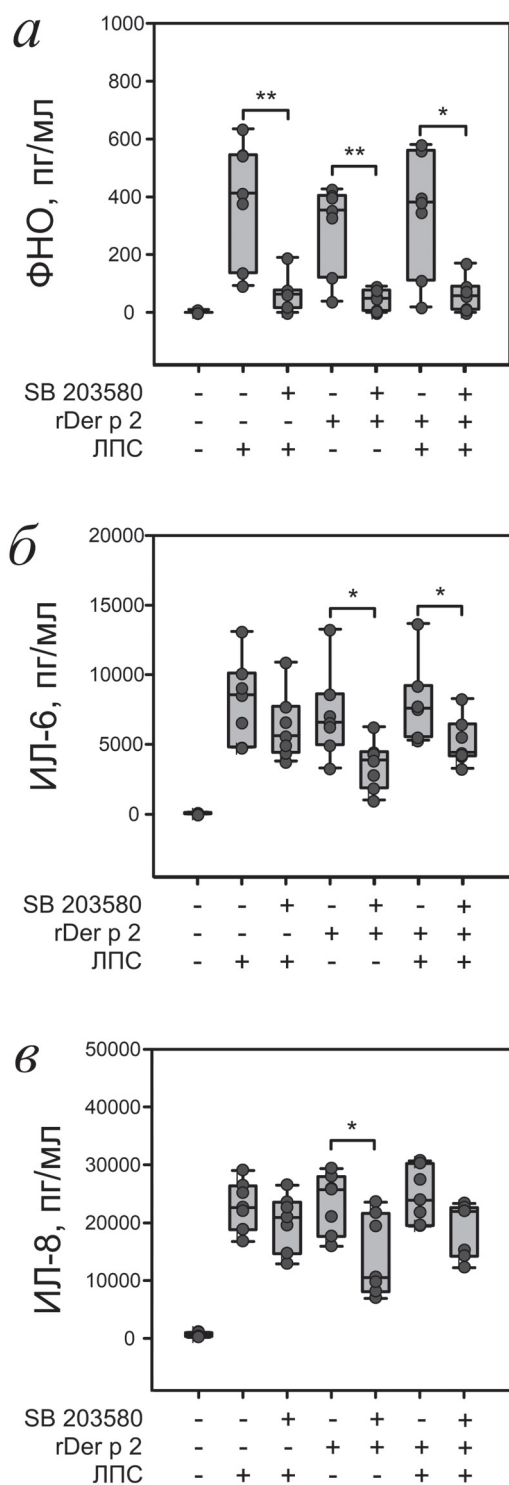


Рис. 2. Концентрации цитокинов, секретированных РВМС в ответ на ЛПС, rDer p 2 или их комбинацию при ингибировании р38 МАРК. *а* – Концентрация ФНО после 6 ч инкубации, *б* – концентрация ИЛ-6 после 16 ч инкубации, *в* – концентрация ИЛ-8 после 16 ч инкубации. Концентрация SB 203580 – 10 μ M. Данные представлены в виде медиан и перцентилей 10, 25, 75 и 90%. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – статистически достоверное различие между выборками, обозначенными скобками

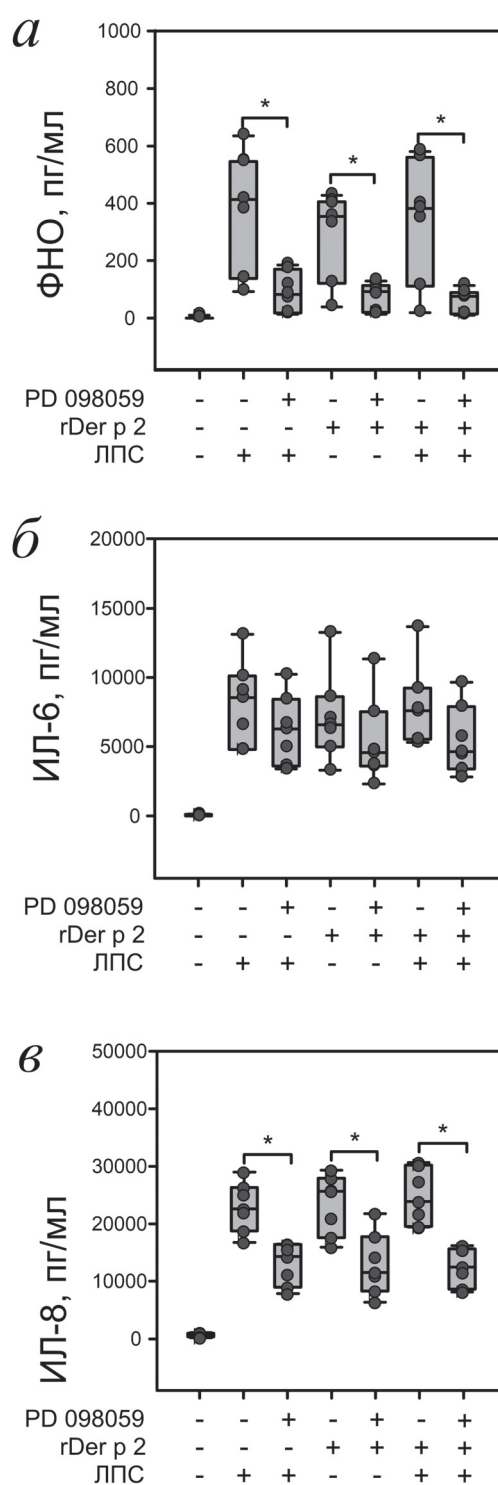


Рис. 3. Концентрации цитокинов, секретированных РВМС в ответ на ЛПС, rDer p 2 или их комбинацию при ингибировании MEK1/2. *а* – Концентрация ФНО после 6 ч инкубации, *б* – концентрация ИЛ-6 после 16 ч инкубации, *в* – концентрация ИЛ-8 после 16 ч инкубации. Данные представлены в виде медиан и перцентилей 10, 25, 75 и 90%. Концентрация PD 098059 – 50 μ M. * $p < 0,05$ – статистически достоверное различие между выборками, обозначенными скобками

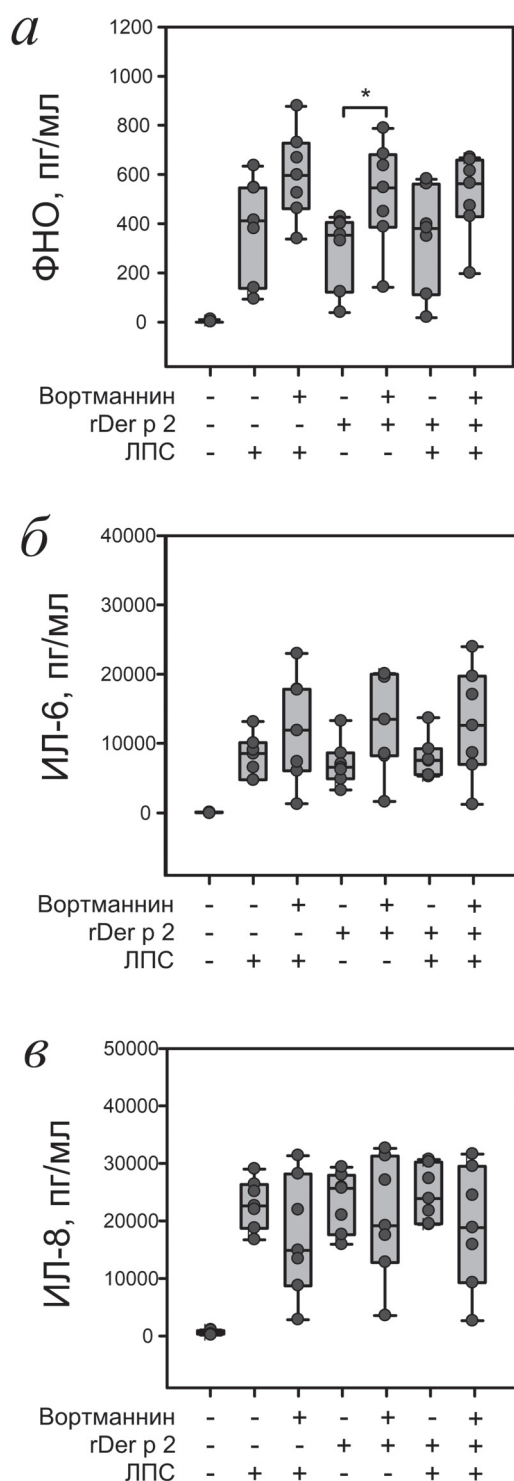


Рис. 4. Концентрации цитокинов, секретированных РВМС в ответ на ЛПС, rDer p 2 или их комбинацию при ингибировании РІЗК. *а* – Концентрация ФНО после 6 ч инкубации, *б* – концентрация ИЛ-6 после 16 ч инкубации, *в* – концентрация ИЛ-8 после 16 ч инкубации. Данные представлены в виде медиан и перцентилей 10, 25, 75 и 90%. Концентрация вортманнина – 100 нМ. * $p < 0,05$ – статистически достоверное различие между выборками, обозначенными скобками

ответы клеток на rDer p 2 в концентрации 0,5 мкг/мл – наименьшей из достаточных для активации РВМС.

p38 МАРК играет ключевую роль в синтезе ФНО РВМС в ответ на ЛПС и/или rDer p 2. При активации РВМС при действии ЛПС и rDer p 2 содержание ФНО, ИЛ-6 и ИЛ-8 достоверно увеличивалось по сравнению с контролем (рис. 2). Их комбинация не усиливала секрецию цитокинов по сравнению с агентами, внесенными по отдельности. Ингибитор p38 МАРК SB 203580 снижал секрецию ФНО в ответ на ЛПС (рис. 2, *а*), но не влиял на ЛПС-индуцированную секрецию ИЛ-6 и ИЛ-8 (рис. 2, *б*, *в*). SB 203580 ингибировал секрецию всех исследуемых цитокинов в ответ на rDer p 2 (рис. 2), что указывает на участие p38 МАРК в регуляции синтеза ИЛ-6 и ИЛ-8 в ответ на аллерген. Ингибирование p38 МАРК снижало секрецию ФНО и ИЛ-6 в ответ на комбинацию rDer p 2 и ЛПС, что указывает на сохранение вклада p38 МАРК в регуляцию секреции данных цитокинов при комбинированном действии rDer p 2 и ЛПС. Секреция ИЛ-8 в ответ на комбинацию rDer p 2 и ЛПС при ингибировании p38 МАРК не изменялась. На основании полученных данных мы предположили, что при сочетанном действии rDer p 2 и ЛПС секреция ФНО и ИЛ-6 регулируется с участием p38 МАРК, а основным эффектором выступает Der p 2. Секреция ИЛ-8 в ответ на комбинацию агентов не зависит от участия p38 МАРК и обеспечивается за счёт ЛПС.

МЕК1/2-зависимый путь передачи сигнала является основным при синтезе ФНО и ИЛ-8 РВМС в ответ на ЛПС и/или rDer p 2. PD 098059, ингибитор МЕК1/2, не влиял на ЛПС- и rDer p 2-индуцированную секрецию ИЛ-6, но уменьшал секрецию ФНО и ИЛ-8 во всех вариантах эксперимента (рис. 3). Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что МЕК1/2 участвует в регуляции секреции ФНО и ИЛ-8, вызванной ЛПС и аллергеном, но не влияет на секрецию ИЛ-6. При ингибировании МЕК1/2 секреция ФНО в ответ на ЛПС, rDer p 2 и их комбинацию была снижена относительно соответствующих образцов без ингибиторов (рис. 3, *а*). Следовательно, МЕК1/2 играет критическую роль в регуляции секреции ФНО при сочетанном действии ЛПС и rDer p 2.

Мы предполагаем, что вклады ЛПС или rDer p 2 в индукцию ответа на их комбинацию сопоставимы. Блокирование МЕК1/2 не влияло на секрецию ИЛ-6 РВМС человека в ответ на комбинацию ЛПС и rDer p 2 и её отдельные

компоненты (рис. 3, б). Наши данные указывают на то, что путь регуляции секреции ИЛ-6 в ответ на ЛПС и Der p 2 не зависит от MEK1/2. Ингибирование MEK1/2 снижало секрецию ИЛ-8 на комбинацию ЛПС + rDer p 2, а также её отдельные компоненты (рис. 3, в), что указывает на критическую роль MEK1/2 в ответах клеток человека на аллерген и ЛПС. Мы предположили, что вклады ЛПС или rDer p 2 в регуляцию секреции ИЛ-8, как в случае ФНО, сопоставимы.

PI3K негативно регулирует продукцию ФНО при активации клеток rDer p 2. Ингибирование PI3K не влияло на секрецию ИЛ-6 и ИЛ-8 в ответ на комбинацию rDer p 2 и ЛПС и отдельное действие веществ (рис. 4, б, в), что указывает на то, что секреция данных цитокинов РВМС в ответ на rDer p 2 и/или ЛПС не зависит от PI3K. Блокирование PI3K не влияло на ЛПС-индуцированную секрецию ФНО (рис. 4, а), но увеличивало секрецию ФНО в ответ на rDer p 2. При действии комбинацией rDer p 2 и ЛПС достоверного увеличения секреции ФНО на фоне блокирования PI3K не наблюдалось. Следовательно, PI3K регулирует секрецию ФНО по механизму отрицательной обратной связи в ответ на rDer p 2, но не ЛПС или их комбинацию.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мы исследовали вклады MAP-киназ в регуляцию секреции провоспалительных цитокинов РВМС человека в ответ на комбинацию rDer p 2 и ЛПС, а также указанные агенты по отдельности. Мы обнаружили, что низкие концентрации rDer p 2 (0,5 мкг/мл) достаточны для активации клеток к продукции цитокинов (рис. 1). Мы не обнаружили статистически значимых изменений жизнеспособности РВМС после инкубации с исследуемыми агентами (данные не представлены). Это согласуется с литературными данными, полученными при стимуляции клеток при помощи ЛПС и Der p 2 в концентрациях, сопоставимых или превышающих используемые в настоящей работе [28, 29], следовательно, изменения секреции цитокинов вызваны специфическим действием rDer p 2 и ЛПС, а не изменением жизнеспособности клеток.

Комбинация rDer p 2 и ЛПС усиливала секрецию ФНО, ИЛ-6 и ИЛ-8 РВМС человека, что согласуется с литературными данными [30]. Мы предполагали наличие синергического эффекта rDer p 2 и ЛПС на секрецию цито-

кинов, как нами было показано в предыдущем исследовании на цельной крови [23], однако в случае РВМС синергического эффекта не наблюдалось.

Стоит также отметить значительное различие концентраций секретируемых цитокинов РВМС и клетками цельной крови, что вызвано различием объектов исследования. В статье Radzyukevich et al. исследования выполнялись на цельной крови *ex vivo*: образец содержал все форменные элементы крови и 10%-ную сыворотку донора. Такой подход позволяет получить приближенный к *in vivo* ответ клеток, но не дает возможности оценить вклад отдельных элементов системы (в нашем случае, клеток крови). Для оценки вклада мононуклеарной фракции клеток крови (моноциты и лимфоциты) мы исследовали ответ изолированных РВМС человека на комбинацию rDer p 2 и ЛПС.

В случае исследования, выполненного на РВМС, в образце отсутствуют форменные элементы, способные модифицировать цитокиновый ответ на ЛПС и/или Der p 2: другие типы клеток (в частности, нейтрофилы) и белки сыворотки крови (в частности, sMD-2) [7, 31].

Для оценки вклада киназ в активацию РВМС человека мы применяли специфические ингибиторы киназ: SB 203580 — ингибитор p38 MAPK, PD 098059 — ингибитор MAPKK (MEK1 и MEK2), вортманнин — ингибитор PI3K [32, 33]. Ингибиторы MAPK можно рассматривать как потенциальные терапевтические противовоспалительные агенты [34]. Мы оценили потенциальную противовоспалительную активность ингибиторов SB 203580 и PD 098059 в отношении комбинации rDer p 2 и ЛПС. Нами было обнаружено, что оба ингибитора могут оказывать потенциальное противовоспалительное действие в отношении секреции ФНО, ИЛ-6 и ИЛ-8 в ответ на комбинацию rDer p 2 и ЛПС, а также её отдельных компонентов (рис. 1, 2). Следовательно, ингибиторы MAPK можно рассматривать как потенциальные агенты для терапии воспаления, вызванного комбинацией аллергии и инфекции.

Нами показано, что РВМС человека синтезируют ФНО преимущественно по MAPK-зависимому пути во всех вариантах эксперимента (рис. 5), что согласуется с литературными данными [35]. Ингибирование p38 MAPK в случае активации клеток rDer p 2 также влияло на продукцию ИЛ-6.

рование PI3K вызывает активацию NFκB, ERK1/2, p38 MAPK и JNK и увеличение секреции ФНО, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-12 [20, 41–44]. На основании данных об участии PI3K-зависимых сигнальных путей в негативной регуляции синтеза провоспалительных цитокинов в ответ на ЛПС мы исследовали влияние ингибирования PI3K на наработку ФНО, ИЛ-6, ИЛ-8 при активации РВМС ЛПС, гDer p 2 или их комбинацией. При ингибировании PI3K наблюдалась тенденция к увеличению синтеза ФНО и ИЛ-6 во всех вариантах эксперимента. Однако достоверное изменение уровня цитокина наблюдалось только в случае активации клеток гDer p 2 и продукции ФНО (рис. 2). Таким образом, PI3K участвует в отрицательной регуляции секреции ФНО РВМС человека в ответ на действие гDer p 2. Насколько нам известно, указанное явление описано впервые в настоящей работе. Отличия с известными данными литературы могут быть объяснены различием в используемых нами и авторами других работ серотипами ЛПС.

Нами показано, что присутствие гDer p 2 не усиливает экспрессию цитокинов клетками в ответ на ЛПС. Наши данные указывают на то, что при активации РВМС гDer p 2 проявляет в большей степени свойства холестерин-связывающего белка, чем миметика MD-2 [45].

В настоящей работе были обнаружены различия вкладов киназ ERK1/2, p38 MAPK и PI3K в зависимости от активирующего агента (белок-аллерген и/или ЛПС). Основным регулятором синтеза ФНО при активации РВМС аллергеном являются MAPK-зависимые сигнальные пути. Вклад MEK1/2 и PI3K

в регуляцию синтеза цитокинов РВМС наиболее выражен ответ на гDer p 2.

Различия между внутриклеточными сигнальными путями, регулирующими секрецию цитокинов в ответ на Der p 2 и ЛПС, могут быть вызваны различием рецепторов, распознающих ЛПС и Der p 2. В частности, распознавание комбинации Der p 2 + ЛПС может происходить с участием TLR4, как это описано при аллергической астме [46, 47]. Der p 2 могут распознаваться РВМС человека через TLR2, как это описано для других типов клеток [11, 48]. Экспериментальная проверка данного предположения является задачей будущих исследований.

Благодарности. Авторы выражают свою благодарность сотрудникам БПНЦ РАН Акимовой Ольге Николаевне (за забор биоматериала для обследования) и Банниковой Надежде Павловне (за помощь в организации исследования).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам Национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики, были одобрены Локальным этическим комитетом Больницы научного центра Пущино (№ 2 от 10.04.2014). От каждого из добровольцев было получено информированное согласие на участие в исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thomas, W. R., Hales, B. J., Smith, W. A (2010) House dust mite allergens in asthma and allergy, *Trends Mol. Med.*, **16**, 321-328, doi: 10.1016/j.molmed.2010.04.008.
2. Gregory, L. G., and Lloyd, C. M. (2011) Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung, *Trends Immunol.*, **32**, 402-411, doi: 10.1016/j.it.2011.06.006.
3. Post, S., Nawijn, M. C., Hackett, T. L., Baranowska, M., Gras, R., et al. (2012) The composition of house dust mite is critical for mucosal barrier dysfunction and allergic sensitization, *Thorax*, **67**, 488-495, doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-200606.
4. Reithofer, M., and Jahn-Schmid, B. (2017) Allergens with protease activity from house dust mites, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 1368, doi: 10.3390/ijms18071368
5. Douwes, J., Zuidhof, A., Doekes, G., van der Zee, S. C., Wouters, I., et al. (2000) (1→3)-beta-D-glucan and endotoxin in house dust and peak flow variability in children, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **162** (4 Pt 1), 1348-1354, doi: 10.1164/ajrccm.162.4.9909118.

6. Jacquet, A. (2013) Innate immune responses in house dust mite allergy, *ISRN Allergy*, 735031, doi: 10.1155/2013/735031.
7. Keber, M. M., Gradisar, H., and Jerala, R. (2005) MD2 and Der p 2 - a tale of two cousins or distant relatives? *J. Endotoxin Res.*, **11**, 186-192, doi: 10.1179/096805105X35206.
8. Cohn, L., Elias, J. A., and Chupp, G. L. (2004) Asthma: Mechanisms of disease persistence and progression, *Annu. Rev. Immunol.*, **22**, 789-815, doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104716.
9. Liu, C. F., Drocourt, D., Puzo, G., Wang, J. Y., and Riviere, M. (2013) Innate immune response of alveolar macrophage to house dust mite allergen is mediated through TLR2/-4 co-activation, *PLoS One*, **8**, e75983, doi: 10.1371/journal.pone.0075983.
10. Stremnitzer, C., Manzano-Szalai, K., Starkl, P., Willensdorfer, A., Schrom, S., et al. (2014) Epicutaneously applied Der p 2 induces a strong TH 2-biased antibody response in C57BL/6 mice, independent of functional TLR4, *Allergy*, **69**, 741-51, doi: 10.1111/all.12399.
11. Chiou, Y. L., and Lin, C. Y. (2009) Der p 2 activates airway smooth muscle cells in a TLR2/MyD88-dependent manner to induce an inflammatory response, *J. Cell. Physiol.*, **220**, 311-318.
12. Yin, S. C., Liao, E. C., Chiu, C. L., Chang, C. Y., and Tsai, J. J. (2015) Der p 2 Internalization by epithelium synergistically augments toll-like receptor-mediated proinflammatory signaling, *Allergy Asthma Immunol. Res.*, **7**, 393-403.
13. Liao, E. C., Hsieh, C. W., Chang, C. Y., Yu, S. J., Sheu, M. L., et al. (2015) Enhanced allergic inflammation of Der p 2 affected by polymorphisms of MD2 promoter, *Allergy Asthma Immunol. Res.*, **7**, 497-506, doi: 10.4168/aair.2015.7.5.497.
14. Tsai, J. J., Liu, S. H., Yin, S. C., Yang, C. N., Hsu, H. S., et al. (2011) Mite allergen Der-p2 triggers human B lymphocyte activation and Toll-like receptor-4 induction, *PLoS One*, **6**, e23249, doi: 10.1371/journal.pone.0023249.
15. Trompette, A., Divanovic, S., Visintin, A., Blanchard, C., Hegde, R. S., et al. (2009) Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein, *Nature*, **457**, 585-588.
16. Kim, D. H., Choi, E., Lee, J. S., Lee, N. R., Baek, S. Y., et al. (2015) House dust mite allergen regulates constitutive apoptosis of normal and asthmatic neutrophils via toll-like receptor 4, *PLoS One*, **10**, e0125983, doi: 10.1371/journal.pone.0125983.
17. Lin, C. H., Lin, H. H., Kuo, C. Y., and Kao, S. H. (2017) Aeroallergen Der p 2 promotes motility of human non-small cell lung cancer cells via toll-like receptor-mediated up-regulation of urokinase-type plasminogen activator and integrin/focal adhesion kinase signaling, *Oncotarget*, **14**, 11316-11328, doi: 10.18632/oncotarget.14514.
18. Wang, W. C., Tsai, J. J., Kuo, C. Y., Chen, H. M., and Kao, S. H. (2011) Non-proteolytic house dust mite allergen, Der p 2, upregulated expression of tight junction molecule claudin-2 associated with Akt/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway, *J. Cell Biochem.*, **112**, 1544-1551, doi: 10.1002/jcb.23067.
19. Lee, N. R., Baek, S. Y., Gu, A., Kim, D. H., Kim, S. Y., et al. (2016) House dust mite allergen suppresses neutrophil apoptosis by cytokine release via PAR2 in normal and allergic lymphocytes, *Immunol. Res.*, **64**, 123-132, doi: 10.1007/s12026-015-8730-5.
20. Zhou, B., Weng, G., Huang, Z., Liu, T., and Dai, F. (2018) Arctiin prevents LPS-induced acute lung injury via inhibition of PI3K/AKT signaling pathway in mice, *Inflammation*, **41**, 2129-2135, doi: 10.1007/s10753-018-0856-x.
21. Scherle, P. A., Jones, E. A., Favata, M. F., Daulerio, A. J., Covington, M. B., et al. (1998) Inhibition of MAP kinase kinase prevents cytokine and prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-stimulated monocytes, *J. Immunol.*, **161**, 5681-5686.
22. Earl, C. S., An, S. Q., and Ryan, R. P. (2015) The changing face of asthma and its relation with microbes, *Trends Microbiol.*, **23**, 408-418.
23. Radzyukevich, Y. V., Kosyakova, N. I., and Prokhorenko, I. R. (2018) Synergistic effect of *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen and *Escherichia coli* lipopolysaccharide on human blood cells, *PLoS One*, **13**, e0207311, doi: 10.1371/journal.pone.0207311.
24. Koch, L., Frommhold, D., Buschmann, K., Kuss, N., Poeschl, J., et al. (2014) LPS- and LTA-induced expression of IL-6 and TNF- α in neonatal and adult blood: role of MAPKs and NF- κ B, *Mediators Inflamm.*, 283126, doi: 10.1155/2014/283126.
25. Haslett, C., Guthrie, L. A., Kopaniak, M. M., Johnston, R. B., and Henson, P. M. (1985) Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide, *Am. J. Pathol.*, **119**, 101-110.
26. Wibowo, H., Harbuwono, D. S., Tahapary, D. L., Kartika, R., Pradipta, S., et al. (2021) Impact of sodium butyrate treatment in LPS-stimulated peripheral blood mononuclear cells of poorly controlled type 2 DM, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **12**, 652942, doi: 10.3389/fendo.2021.652942.
27. Jansky, L., Reymanova, P., and Kopecky, J. (2003) Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or infected by *Borrelia*, *Physiol. Res.*, **52**, 593-598.
28. Schildberger, A., Rossmanith, E., Eichhorn, T., Strassl, K., and Weber, V. (2013) Monocytes,

- peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide, *Mediators Inflamm.*, **2013**, 697972, doi: 10.1155/2013/697972.
29. Park, B. S., Lee, N. R., Kim, M. J., Kim, S. Y., and Kim, I. S. (2015) Interaction of Der p 2 with Toll-like receptor 4 and its effect on cytokine secretion, *Biomed. Sci. Lett.*, **21**, 152-159.
 30. Matera, G., Quirino, A., Giancotti, A., Pulicari, M. C., Rametti, L., et al. (2012) Procalcitonin neutralizes bacterial LPS and reduces LPS-induced cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells, *BMC Microbiol.*, **12**, 68, doi: 10.1186/1471-2180-12-68.
 31. Pei, Z., and Wang, J. (2014) Propofol attenuates LPS-induced tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and nitric oxide expression in canine peripheral blood mononuclear cells possibly through down-regulation of nuclear factor (NF)- κ B activation, *J. Vet. Med. Sci.*, **77**, 139-145, doi: 10.1292/jvms.14-0212
 32. Kim, I. S., Lee, N. R., and Lee, J. S. (2016) Suppressive effect of Der p 2 on constitutive neutrophil apoptosis by cytokine secretion of normal and allergic lymphocytes, *Kor. J. Clin. Lab. Sci.*, **48**, 102-108.
 33. Kumar, S., Boehm, J., and Lee, J. C. (2003) p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 717.
 34. Simon, C., Hicks, M. J., Nemecek, A. J., Mehta, R., O'Malley, B. W. Jr., Goepfert, H., et al. (1999) PD 098059, an inhibitor of ERK1 activation, attenuates the in vivo invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma, *Br. J. Cancer*, **80**, 1412-1419, doi: 10.1038/sj.bjc.6690537.
 35. Brunn, G. J., Williams, J., Sabers, C., Wiederrecht, G., Lawrence, J. C. Jr., et al. (1996) Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002, *EMBO J.*, **15**, 5256-5267.
 36. Newton, R., Cambridge, L., Hart, L. A., Stevens, D. A., Lindsay, M. A., et al. (2000) The MAP kinase inhibitors, PD098059, UO126 and SB203580, inhibit IL-1 β -dependent PGE(2) release via mechanistically distinct processes, *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 1353-1361, doi: 10.1038/sj.bjp.0703431.
 37. Fehr, S., Unger, A., Schaeffeler, E., Herrmann, S., Laufer, S., et al. (2015) Impact of p38 MAP kinase inhibitors on LPS-induced release of TNF- α in whole blood and primary Cells from different species, *Cell Physiol. Biochem.*, **36**, 2237-2249, doi: 10.1159/000430188.
 38. Tong, W., Chen, X., Song, X., Chen, Y., Jia, R., et al. (2020) Resveratrol inhibits LPS-induced inflammation through suppressing the signaling cascades of TLR4NF- κ B/MAPKs/IRF3, *Exp. Ther. Med.*, **19**, 1824-1834, doi: 10.3892/etm.2019.8396.
 39. Fukao, T., and Koyasu, S. (2003) PI3K and negative regulation of TLR signaling, *Trends Immunol.*, **24**, 358-363.
 40. Косякова Н. И., Радзюкевич Я. В., Морозова А. А., Прохоренко И. Р. (2019) Активация клеток крови ЛПС и ДрЕ: роль sMD-2 и p38 MAPK в развитии аллергического воспаления, *Росс. Аллергол. Журн.*, **16**, 81-84.
 41. Guha, M., and Mackman, N. (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.*, **13**(2), 85-94, doi: 10.1016/s0898-6568(00)00149-2.
 42. Yin, S. C., Liao, E. C., Ye, C. X., Chang, C. Y., and Tsai, J. J. (2018) Effect of mite allergenic components on innate immune response: Synergy of protease (Group 1 & 3) and non-protease (Group 2 & 7) allergens, *Immunobiology*, **223**, 443-448, doi: 10.1016/j.imbio.2017.10.032.
 43. Kramer, P. R., Winger, V., and Reuben, J. (2009) PI3K limits TNF- α production in CD16-activated monocytes, *Eur. J. Immunol.*, **39**, 561-570, doi: 10.1002/eji.200838801.
 44. Luyendyk, J. P., Schabbauer, G. A., Tencati, M., Holscher, T., Pawlinski, R., et al. (2008) Genetic analysis of the role of the PI3K-Akt pathway in lipopolysaccharide-induced cytokine and tissue factor gene expression in monocytes/macrophages, *J. Immunol.*, **180**, 4218-4226, doi: 10.4049/jimmunol.180.6.4218.
 45. Reginald, K., and Chew, F. T. (2019) The major allergen Der p 2 is a cholesterol binding protein, *Sci. Rep.*, **9**, 1556, doi: 10.1038/s41598-018-38313-9.
 46. Marichal, T., Bedoret, D., Mesnil, C., Pichavant, M., Goriely, S., et al. (2010) Interferon response factor 3 is essential for house dust mite-induced airway allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **126**, 836-844.e13, doi: 10.1016/j.jaci.2010.06.009.
 47. Ryu, J. H., Yoo, J. Y., Kim, M. J., Hwang, S. G., Ahn, K. C., et al. (2013) Distinct TLR-mediated pathways regulate house dust mite-induced allergic disease in the upper and lower airways, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **131**, 549-561, doi: 10.1016/j.jaci.2012.07.050.
 48. Tanyaratrisakul, S., Jirapongsananuruk, O., Thomas, W. R., Piboonpocanun, S., Voelke, D. R. (2012) Der p 2 stimulate inflammatory responses from lung epithelial cells and macrophages through the TLR2 and MAPK pathway, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **129**, AB140, doi: 10.1016/j.jaci.2011.12.469.

**PARTICIPATION OF MAPK AND PI3K
IN THE REGULATION OF CYTOKINE SECRETION
BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS
IN RESPONSE TO *Escherichia coli* LPS AND rDer p 2 COMBINATION**

A. A. Morozova^{1,2*}, N. I. Kosyakova¹, and I. R. Prokhorenko²

¹ Hospital of Pushchino Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: honorikvudi@mail.ru

² Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

Search for the effective approaches to treat acute inflammation caused by combination of allergens and infectious agents is an important task for public health worldwide. House dust mites *Dermatophagoides pteronyssinus* are the source of allergens of the Der p groups and of microbial compounds, in particular, lipopolysaccharides (LPS). LPS and Der p 2 induce secretion of pro-inflammatory cytokines via activation of kinases p38 MAPK, MEK 1/2, and PI3K. Participation of these kinases in the regulation of cells response to combined exposure to LPS and Der p 2 has not been sufficiently studied. We studied the effects of kinases (p38 MAPK, MEK 1/2, and PI3K) inhibition on secretion of cytokines (TNF, IL-8, and IL-6) by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy volunteers in response to *E. coli* LPS and rDer p 2. Contribution of kinases to the regulation of cell response to different agents (rDer p 2 and/or LPS) was revealed. It was found that p38 MAPK plays a key role in the regulation of secretion TNF by PBMC in response to the combination of LPS and rDer p 2. MEK 1/2-dependent signaling is the main pathway for the synthesis of TNF and IL-8 in response to LPS and rDer p 2. PI3K-dependent signaling negatively regulates TNF production during rDer p 2-induced cell activation, but is not involved in the response to the combination of LPS and rDer p 2. PI3K-dependent signaling in the regulation of PBMC cytokine synthesis is most pronounced in response to their activation by rDer p 2. Understanding the mechanisms of immune cell responses to combinations of inflammatory agents could facilitate the search for new intracellular targets for anti-inflammatory therapy.

Keywords: PBMC, p38 MAPK, MEK 1/2, PI3K, Der p 2, lipopolysaccharides, cytokines

УДК 577.151.4

МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ФЕРМЕНТ С ЭНДОГЛЮКАНАЗНОЙ И АЛЬГИНАЗО/ГЛЮКУРОНАН-ЛИАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ИЗ БАКТЕРИИ *Cellulophaga lytica*

© 2022 А.В. Лисов^{1*}, С.С. Киселев², Л.И. Трубицина¹, О.В. Белова¹,
Ж.И. Андреева-Ковалевская¹, И.В. Трубицин¹, Т.В. Шушкова¹, А.А. Леонтьевский¹

¹ Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН,
142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: ssl208@rambler.ru

² Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биофизики клетки РАН,
142290 Пушкино, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 18.04.2022

После доработки 30.05.2022

Принята к публикации 30.05.2022

Cellulophaga lytica — граммотрицательная аэробная бактерия, в геноме которой обнаружено множество генов, кодирующих ферменты, расщепляющие полисахариды. Один из ферментов, названный ClGP, содержит домен гликозил-гидролазы семейства GH5 и домен полисахарид-лиазы семейства PL31. Фермент также содержит ТАТ-сигнальный пептид и TIGR04183-домен, что указывает на внеклеточную природу ClGP. Филогенетический анализ показывает, что наиболее близкие к ClGP и содержащие ТАТ-сигнальный пептид и домены GH5, PL31 и TIGR04183 ферменты, широко распространены среди бактерий, принадлежащих к семейству Flavobacteriaceae. ClGP, продуцируемый рекомбинантным штаммом *Escherichia coli*, был очищен и охарактеризован. ClGP демонстрирует эндоглюканазную (EC 3.2.1.4) активность и катализирует гидролиз β-D-глюкана, натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ-Na), аморфной целлюлозы, но не кристаллической целлюлозы и ксилана. Продуктами гидролиза КМЦ-Na являются целлобиоза и целлотриоза, при гидролизе β-D-глюкана обнаруживаются глюкоза, целлобиоза, целлотетроза и целлопентоза. ClGP наиболее эффективен с поли-β-D-маннуронатными, чем с поли-α-L-гулуронатными участками альгиновой кислоты. В связи с этим можно предположить, что ClGP является PolyM-лиазой (EC 4.2.2.3). ClGP активен по отношению к полиглюкуроновой кислоте, что указывает на его глюкуронан-лиазную активность (EC 4.2.2.14). Фермент отличается нейтральным pH-оптимумом, стабильностью в диапазоне pH 6,0–8,0 и невысокой термостабильностью. ClGP эффективно осахаривает два вида бурых водорослей, *Saccharina latissima* и *Laminaria digitata*, что в дальнейшем позволяет использовать его в производстве биотоплива из макроводорослей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: GH5-эндоглюканаза, PL31-альгиназа, мультифункциональный фермент, осахаривание микроводорослей.

DOI: 10.31857/S0320972522060094, EDN: AUSTMD

ВВЕДЕНИЕ

Полисахариды — обширная группа полимерных углеводов, входящих в состав клеточных стенок растений, грибов и бактерий, являющихся наиболее распространёнными веществами биосферы. Полисахариды состо-

Принятые сокращения: КМЦ-Na — натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы; МКЦ — микрокристаллическая целлюлоза; GH — гликозил-гидролаза; PL — полисахарид-лиаза; PolyM, PolyG, PolyGlu — полиманнуроновая, полиглюкуроновая и полиглюкуроновая кислоты соответственно.

* Адресат для корреспонденции.

ят из различных, часто модифицированных (метилованных, ацетилованных, ферулированных и т.д.), сахаров, связанных гликозидной связью [1]. Способностью расщеплять полисахариды обладают различные микроорганизмы, бактерии и грибы, разрушающие клеточную стенку. Микроорганизмы используют различные комбинации ферментов для деградации. Гликозил-гидролазы (GH) катализируют деструкцию гликозидных связей в присутствии воды, а полисахарид-лиазы (PL) расщепляют полисахариды путём негидролитического и неокислительного разрыва угле-

водной цепи [2, 3]. Важную роль в декомпозиции полисахаридов играет процесс окисления. Например, литические полисахарид-монооксигеназы расщепляют гликозидные связи путём включения одного атома окисляющего агента — кислорода — в молекулу субстрата в присутствии подходящего восстановительного агента [4]. Полисахариды также могут подвергаться деструкции гидроксильными радикалами, образующимися при действии лакказы и целлобиозодегидрогеназы [5].

Как гликозил-гидролазы, так и полисахарид-лиазы проявляют широкую субстратную специфичность, что связано с огромным разнообразием структур полисахаридов. На основании сходства последовательностей GH, PL и другие ферменты деструкции полисахаридов подразделяются на различные семейства [6]. Полная информация об углевод-активных ферментах и их классификация представлены в базе данных CAZy (<http://www.cazy.org/>). Ферменты, принадлежащие к одному семейству, могут отличаться субстратной специфичностью [7] и эффективно расщеплять несколько субстратов. Мультифункциональные ферменты, способные катализировать несколько различных реакций, часто встречаются среди ферментов, активных в отношении полисахаридов, в особенности среди гликозил-гидролаз. Мультифункциональность может проявляться двумя способами. Одни ферменты способны взаимодействовать с различными субстратами благодаря особой структуре своего активного центра. Примерами таких ферментов являются целлюлаза-ксилаза бактерий *Chryseobacterium* sp. или *Clostridium thermocellum* и целлюлаза-маннаназа *Thermotoga maritima* [8–10]. Другие мультифункциональные ферменты содержат в своей молекуле несколько каталитических доменов. Например, бифункциональный фермент с двумя каталитическими доменами *Ruminococcus flavefaciens* проявляет как ксиланазную, так и β -(1,3–1,4)-глюканазную активность [11]. Наличие нескольких каталитических доменов позволяет расширить каталитические возможности фермента и эффективно взаимодействовать с различными субстратами. В качестве примера можно привести фермент, полученный из метагеномной ДНК, содержащий три каталитических домена и проявляющий α -L-арабинофуранозидазную, ксиланазную и ферулоил-эстеразную активности [12]. Двухдоменный фермент *Bacillus* sp. обладает

пектат-лиазной и метил-эстеразной активностью и принадлежит к двум различным классам ферментов [13].

Cellulophaga lytica — грамотрицательная аэробная бактерия из семейства Flavobacteriaceae, распространённая в литеральной зоне на поверхности водорослей и пляжной грязи [14]. Анализ полного генома этой бактерии выявил наличие десятков генов, кодирующих ферменты, участвующие в расщеплении полисахаридов [15]. Один из ферментов (GenBank ADY28795.1) содержал последовательности каталитических доменов гликозил-гидролазы семейства GH5 и полисахарид-лиазы семейства PL31 (<http://www.cazy.org/b1554.html>). Таким образом, этот фермент потенциально может проявлять мультифункциональность и предположительно способен катализировать расщепление β -(1,4)-глюканов, альгиновой и полиглюкуроновой кислот (<http://www.cazy.org/GH5.html>; <http://www.cazy.org/PL31.html>), что не удивительно, так как *C. lytica* обитает на поверхности водорослей, чья клеточная стенка состоит в основном из этих веществ [16, 17]. В данной работе был получен рекомбинантный штамм *Escherichia coli*, продуцировавший потенциально мультифункциональный фермент из *C. lytica*, были исследованы свойства и биотехнологический потенциал фермента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование штамма и реактивы. *C. lytica* VKM B-1433 (=DSM 7489) был получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (<http://www.vkm.ru/index.htm>). Штамм культивировали при 29 °C (pH 7,2) в среде следующего состава (г/литр): дрожжевой экстракт — 1,0; триптон — 1,0; KCl — 0,7; NaCl — 24,7; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ — 6,3; $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ — 4,6; $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ — 1,2; NaHCO_3 — 0,2.

Приготовление буфера Бриттона–Робинсона. Универсальный 0,3 М буфер Бриттона–Робинсона готовили следующим образом: 0,1 М ортофосфорной кислоты, 0,1 М борной кислоты, 0,1 М уксусной кислоты смешивали, значение pH доводили до нужного раствором 1 М NaOH в воде.

В данном исследовании использовали следующие реактивы: соли, кислоты, щелочи, а также некоторые компоненты среды («PanReac AppliChem», США); дрожжевой экстракт

(«Biospringer», Франция); триптон («VWR Life Science AMRESCO», США); микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) «Avicel PH-101», пектин из цедры цитрусовых, натриевая соль альгиновой кислоты, β -D-глюкан из ячменя, ксилан бука, натриевая соль карбоксиметил целлюлозы (КМЦ-Na) («Sigma-Aldrich», США). Полиманнуриновая (PolyM) и полиглюкуроновая (PolyG) кислоты были синтезированы методом кислого гидролиза альгиновых кислот [18]. Полиглюкуроновую кислоту (PolyGlu) синтезировали из аморфной целлюлозы с помощью системы TEMPO-NaBr-NaClO («Sigma-Aldrich») [19]. Аморфную целлюлозу получали регенерацией микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) фосфорной кислотой [20].

Морские макроводоросли *Saccharina latissimi* и *Laminaria digitata* были собраны в Кандалакшском заливе Белого моря в августе 2019 г. Водоросли перед использованием промывали водой и высушивали.

Клонирование, рекомбинантная экспрессия и очистка белка. Ген амплифицировали методом ПЦР с использованием хромосомной ДНК и праймеров Cif1 (GGTACCGGATCCCAATC TCCTGTAGAAAAAC 27) и Cif1 (CTGCAGTC GACCTATTTTTTAACAAATAAAGAACG 27). Праймеры были подобраны при использовании последовательности гена, депонированной в GenBank (NZ_CP009239.1:1037354-1040365). Для создания продуцента на основе клеток *E. coli* M15(pRep4) амплифицированный ген клонировали в векторную плазмиду pQE-30 («Qiagen», Германия), расщеплённую эндонуклеазами рестрикции BamHI и SalI. Скрининг клонов *E. coli*, содержащих рекомбинантные плазмиды, проводили методом ПЦР с использованием универсальных праймеров для pQE30. Затем продукцию белка индуцировали добавлением 0,1 мМ изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ), после чего клетки инкубировали в течение 18 ч при 18 °C при перемешивании со скоростью 50 об/мин. Клетки осаждали центрифугированием («Beckman», США) 30 мин при 3700 g, осадок ресуспендировали в 10 мл 20 мМ фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 0,5 М NaCl и 1 мМ имидазол. После разрушали клетки ультразвуком с использованием прибора Sonicator Q500 («QSonica», США). Затем удаляли клеточный дебрис центрифугированием, и клеточный лизат загружали в колонку HisTrap объёмом 5 мл («GE Healthcare», США), уравновешенную буфером, в котором проводилось ресуспендирование клеток, при скоро-

сти потока 1 мл/мин. Белок элюировали тем же буфером с добавлением 0,3 М имидазола в изократическом режиме при скорости потока 1 мл/мин. После очистки фракции белка диализовали против 50 мМ Tris-HCl-буфера (pH 7,6). Чистоту белка определяли с использованием ДНС-ПААГ-электрофореза в 10%-ном ПААГ.

Определение свойств фермента. Гидролитическую активность фермента в отношении МКЦ, КМЦ-Na, β -D-глюкана и ксилана определяли по образованию восстанавливающих сахаров, образование которых фиксировали с помощью 3,5-динитросалициловой кислоты (ДНС) [21] с использованием глюкозы в качестве стандарта. Одну единицу гидролитической активности (Е) определяли как количество фермента, которое канализует образование 1 мкмоль глюкозы за 1 мин при действии на соответствующий субстрат.

Лиазную активность в отношении пектина, альгиновой кислоты, PolyM, PolyG и PolyGlu определяли методом с использованием тиобарбитуровой кислоты (ТБК) [22]. Образование окрашенного продукта отслеживали спектрофотометрически («Shimadzu», Япония) при длине волны 550 нм. Одну условную единицу активности (yE) определяли как количество фермента, вызывающее изменение оптической плотности на 0,01 Ед. Реакцию проводили в 50 мМ универсальном буфере Бриттона–Робинсона (pH 7,0) [23] при 40 °C и концентрации субстрата – 1%.

Термостабильность и pH-стабильность фермента определяли как остаточную активность после его инкубации при различных температурах или значениях pH. Остаточную активность выражали в процентах; исходную активность фермента принимали за 100%. Термостабильность изучали в 50 мМ универсальном буфере (pH 7,0); концентрация фермента составляла 1 мг/мл. Стабильность pH измеряли в аналогичных условиях, но в диапазоне pH 3,0–9,0. При исследовании pH-стабильности фермент хранили при 5 °C в течение 5 суток в стерильных условиях.

Температурный и pH-оптимум фермента устанавливали в аналогичной буферной системе и при аналогичной концентрации, но результаты представлены в виде относительных активностей, за 100% принято максимальное значение активности.

Концентрацию белка определяли с помощью коэффициента молярной экстинкции, рассчитанного на основе последовательно-

сти белка с помощью программы Vector NTI. Поиск гомологов белков проводили с помощью BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). Для анализа были выбраны последовательности, которые имели по крайней мере 95% покрытия и 50%-ный уровень идентичности. Для определения наличия последовательностей сигнальных пептидов использовали программу SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Уровень идентичности обнаруженных гомологов оценивали с помощью алгоритма парного выравнивания белковых последовательностей Нидлмана–Вунша (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/).

Продукты гидролиза КМЦ-На и β -D-глюкана идентифицировали методом тонкослойной

хроматографии, как описано ранее [24]. Осахаривание водорослей проводили в 50 мМ универсальном буфере (pH 7,0), концентрация водорослей — 2% (w/v), количество белка — 0,5 мг/мл. Водоросли гомогенизировали с помощью мельницы и просеивали через сито с размером ячеек 0,5 мм. Реакцию проводили при 40 °C в течение 24 ч на орбитальном шейкере («Biosan», Латвия). Осахаривание оценивали по образованию восстанавливающих групп методом ДНС и по увеличению оптической плотности при 550 нм при взаимодействии ненасыщенных уоновых кислот с ТБК.

Филогенетический анализ. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей, идентифицированных с помощью

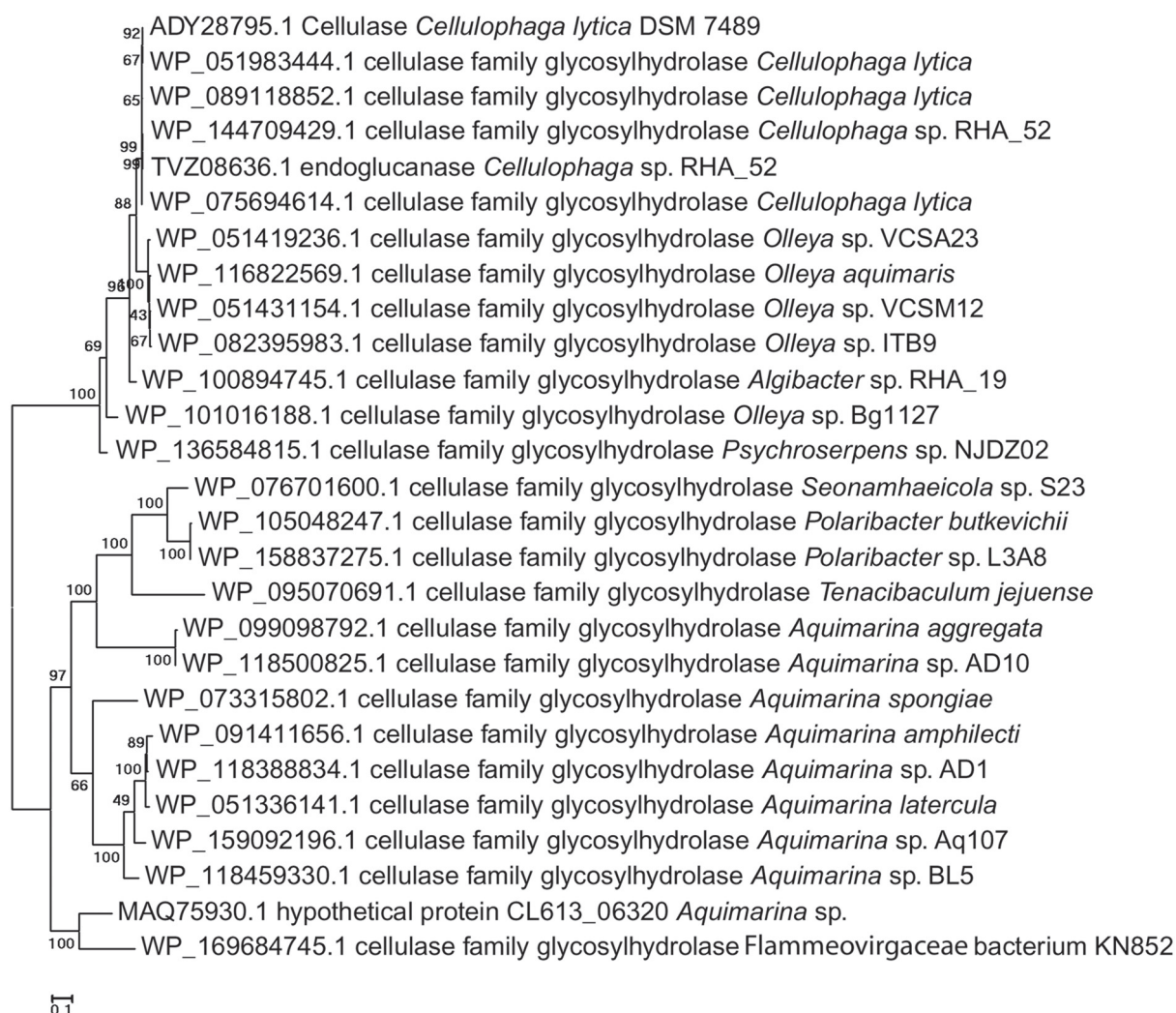


Рис. 1. Филогенетическое дерево для GIGP и его 26 гомологов в разных родах бактерий, построенное методом максимального правдоподобия в программе IQ-TREE. Цифры в узлах указывают значения сверхбыстрого бутстрэп-анализа. Шкала соответствует количеству аминокислотных замен на остаток

BLASTP, проводили с использованием алгоритма MUSCLE [25]. Оптимальную модель замещения определяли с помощью ModelFinder [26], реализованного в программе IQ-TREE (версия 1.6.12) [27]. Филогенетическое дерево было построено на основе множественных выравниваний в программе IQ-TREE с использованием метода максимального правдоподобия. Для получения значений степени ветвления было использовано 1000 реплик [28]. Построенное дерево визуализировали в программе MEGA6 [29].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ген, кодирующий белок ADY28795.1, названный ClGP, был клонирован из геномной ДНК *C. lytica*. Последовательность клонированного гена полностью соответствовала последовательности, депонированной в GenBank. Анализ аминокислотной последовательности белка выявил наличие сигнального пептида ТАТ (1–27 а.о.), домена семейства GH5 (40–289 а.о.), домена семейства PL31 (337–651 а.о.) и домена TIGR04183 (925–997 а.о.). Наличие пептида ТАТ и домена TIGR04183, участвующих в системе секреции белка T9SS [30], свидетельствует о том, что ClGP является внеклеточным ферментом. Поиск гомологичных белков с помощью BLAST показал, что его гомологи присутствуют у 26 штаммов бактерий, относящихся к 8 родам: *Cellulophaga* (WP_144709429.1, WP_051983444.1, WP_075694614.1, WP_089118852.1, TVZ08636.1), *Olleya* (WP_051419236.1, WP_116822569.1, WP_051431154.1, WP_082395983.1, WP_101016188.1), *Algibacter* (WP_100894745.1), *Psychroserpens* (WP_136584815.1), *Seonamhaeicola* (WP_076701600.1), *Polaribacter* (WP_105048247.1, WP_158837275.1), *Aquimarina* (WP_073315802.1, MAQ75930.1, WP_091411656.1, WP_118388834.1, WP_051336141.1, WP_159092196.1, WP_118459330.1, WP_099098792.1, WP_118500825.1), *Tenacibaculum* (WP_095070691.1) и бактерии KN852 (семейство Flammeovirgaceae) (WP_169684745.1). Все эти бактерии являются представителями типа Bacteroidetes; 8 родов относятся к семейству Flavobacteriaceae (класс Flavobacteriia, порядок Flavobacteriales), а бактерия KN852 – к семейству Flammeovirgaceae (класс Cytophagia, порядок Cytophagales). При анализе множественного выравнивания, полученного с помощью алгоритма MUSCLE, мы обнаружили, что оптимальная модель аминокислотных замен – это WAG + F + I + G4 [31, 32],

согласно ModelFinder [26].

Эта модель замещения была впоследствии использована для построения филогенетического дерева, представленного на рис. 1.

Все идентифицированные гомологи ClGP были сгруппированы в три группы с высоким уровнем бутстрэп-поддержки (более 95%). Первая группа состоит из 13 белков – 6 – из *Cellulophaga* (включая ClGP), 5 – из *Olleya*, 1 – из *Algibacter*, 1 – из *Psychroserpens*. Вторая группа содержит 12 белков: 8 – из *Aquimarina*, 2 – из *Polaribacter*, 1 – из *Tenacibaculum*, 1 – белок *Seonamhaeicola*. В третью группу входят 2 оставшихся белка из бактерий *Aquimarina* (MAQ75930.1) и Flammeovirgaceae KN852. Уровень идентичности белков первой группы с ClGP при попарном выравнивании по алгоритму Нидлмана–Вунша варьировал в пределах 80,8–99,4%, при этом наиболее высокий уровень был у ферментов *Cellulophaga* (98,7–99,4%).

Наиболее отдаленным гомологом оказался фермент из бактерии Flammeovirgaceae KN852 (44,7% идентичности с ClGP). Выравнивание аминокислотных последовательностей белков из разных родов бактерий показало наличие доменов ТАТ, GH5, PL31 и TIGR04183, хотя размеры и положение доменов в молекулах различались (рис. 2).

В ходе данной работы был получен рекомбинантный штамм *E. coli* – продуцент фермента ClGP. Продукция белка наблюдалась только для варианта без ТАТ-сигнального пептида (21 а.о. с N-конца) и без домена TIGR04183 (74 а.о. с C-конца). Белок без ТАТ-сигнального пептида, но с TIGR04183 не продуцировался. Продукция белка составила 300 мг на литр культуральной жидкости. Фермент был очищен с помощью метода аффинной хроматографии (рис. 3). Молекулярная масса фермента составляла 101 кДа, что хорошо согласуется с массой белка ClGP, рассчитанной на основе его последовательности.

Присутствие домена семейства GH5 свидетельствует о возможной гидролитической активности ClGP. Ферменты этого семейства широко распространены в природе и обладают различной субстратной специфичностью (<http://www.cazy.org/GH5.html>). Многие белки GH5 проявляют эндоглюканазную (ЕС 3.2.1.4) активность [33]. Установлено, что ClGP обладает эндоглюканазной активностью в отношении таких субстратов, как β-D-глюкан, КМЦ-Na, аморфная целлюлоза,

Aa (1)	MTMKNTSYFLIKNLSKHLLYIFLLTLQISASQSI	VEKHGRLQVKGNTIVDKTNTPTSLAGNSLFSW	NSAGDTSDFYAAETVTHLSNDWNSSIIRVAM	GKESWDNGNGYIDS	PSAQKTKIKKVIDAAIAKGIYVIIDWHTHEA	ENYENAI													
As (1)	MKI IY--EMFTSRGFGYIGFFTLVSLCQNNQ	FPVQGHRLRVGNKIVDKNNPTVSLAGNSLFSW	NSAGDTSDFYNAETVTHLAEADWNSSIIRVAM	GKESWDAGNGYIDS	PNAGQAKIRKVIDAAIDKGIYVIIDWHTHEA	EERYTEAA													
Tj (1)	-----MKLTNTSIPLCFYVIFSLITLNLSSQ	TI VEKHGRLQVKGNTIVDKSNTPVSLAGNSLFSW	NSAGDTSDFYNAETVTHLYNNWNSSIIRVAM	GKESWDGSGRYIDS	PEAQKAKIRKVIDAAIDNGMYVIIDWHTHEA	EAKYDEAV													
Pb (1)	-----MTKLKLFYALFIFSLISYGTQASQSI	VDKHGRLQVKGNTIVDKSGTSPVSLAGNSLFSW	NSAGDTSDFYNAETVTHLYNNWNSSIIRVAM	GKESWDGSGRYIDS	PEAQKAKIRKVIDAAIAKGIYVIIDWHTHEA	EAKYDEAV													
Ss (1)	-----MKNLKPFYVLLIFALISYNTKASQSI	VDKHGRLQVKGNTIVDQNNNAVSLAGNSLFSW	NSAGDSSDFYNAETVTHLYNNWNSSIIRVAM	GKESWDGSGRYIDS	PEAQKAKIRKVIDAAIAKGIYVIIDWHTHEA	EAKYDEAV													
Ps (1)	-----MKKQRIQFKKLMYPLVLTLE--SILNRA	QTPVERHGRQLQVGNRIILNQSGEITSLAGNSLFSW	NSAGDSSDFYNAETVTHLYNNWNSSIIRVAM	GKESWDGSGRYIDS	PEAQKAKIRKVIDAAIAKGIYVIIDWHTHEA	EALYDEAV													
Oa (1)	-----MKRNLQMFKRLMYPLFLMLF--SLSSVA	QSPVEKHGRLQVGNRIILNQSGEITSLAGNSLFSW	NSAGDTSDFYNAETVDFLAEWNWNSSIIRVAM	GKESWDGSGRYIDS	PEAQKAKIRKVIDAAIAKGIYVIIDWHTHEA	EALYDEAV													
Fb (1)	MESKNLLKFRKRKCFLSLIILFI IHFQVYA	QSPVEKHGRLQVGNRIILNQSGEITSLAGNSLFSW	NSAGDTSDFYNAETVTHLYNNWNSSIIRVAM	GKESWDGSGRYIDS	PEAQKAKIRKVIDAAIAKGIYVIIDWHTHEA	EALYDEAV													
Cl (1)	-----MFKRLTYPLFLMLL--SLSSVAQSPVE	KHGRQLQVGNRIILNASGEITSLAGNSLFSW	NSAGDTSDFYNAETVDFLAEWNWNSSIIRVAM	GKESWDGSGRYIDS	PEAQKAKIRKVIDAAIAKGIYVIIDWHTHEA	EALYDEAV													
Aa (151)	DDFKMAETYGDKNDI IYEIYNEPIRQSWSE	VKSATAI IKAIRSKDPDNLI I VSGPTSWQ	QDV DIASNDPINDNTAYTALH FYAG--	THSQGLRDKAI RAMNNGIALFATEWGS	VNADGNGATDKAETQKNMAFFQKNNI	SHVNWASDKP													
As (149)	DDFKMAEQLYGDKQNI IYEVYNEPIRQSWSE	VKSANTVIAAIRSED PDNLI I VSGPTSWQ	QDV DIASNDPINDNTAYTALH FYAG--	THSQGLRDKAI RAMNNGIALFATEWGS	VNADGNGATDKAETQKNMAFFQKNNI	SHVNWASDKP													
Tj (145)	VFFREMAELYGDNVIEIYNEPIRQSWSE	VKSATVIAAIRSED PDNLI I VSGPTSWQ	QDV DIASNDPINDNTAYTALH FYAG--	THSQGLRDKAI RAMNNGIALFATEWGS	VNADGNGATDKAETQKNMAFFQKNNI	SHVNWASDKP													
Pb (143)	AFFFREMAELYGDNVIEIYNEPIRQSWSE	VKSATVIAAIRSED PDNLI I VSGPTSWQ	QDV DIASNDPINDNTAYTALH FYAG--	THSQGLRDKAI RAMNNGIALFATEWGS	VNADGNGATDKAETQKNMAFFQKNNI	SHVNWASDKP													
Ss (143)	AFFFREMAELYGDKNDI IYEIYNEPIRQSW	SEVKSATAI IKAIRSKDPDNLI I VSGPTSWQ	QDV DIASNDPINDNTAYTALH FYAG--	THSQGLRDKAI RAMNNGIALFATEWGS	VNADGNGATDKAETQKNMAFFQKNNI	SHVNWASDKP													
Ps (147)	AFFFRMAELYGDPNMYVIEIYNEPIRQSW	SEVKSATVIAAIRSED PDNLI I VSGPTSWQ	QDV DIASNDPINDNTAYTALH FYAG--	THSQGLRDKAI RAMNNGIALFATEWGS	VNADGNGATDKAETQKNMAFFQKNNI	SHVNWASDKP													
Oa (147)	DDFFRMAELYGDPNMYVIEIYNEPIRQSW	SEVKSATVIAAIRSED PDNLI I VSGPTSWQ	QDV DIASNDPINDNTAYTALH FYAG--	THSQGLRDKAI RAMNNGIALFATEWGS	VNADGNGATDKAETQKNMAFFQKNNI	SHVNWASDKP													
Fb (151)	KFFDTHMAEYGSYDNLVIEIYNEPIRQSW	SEVKSATVIAAIRSED PDNLI I VSGPTSWQ	QDV DIASNDPINDNTAYTALH FYAG--	THSQGLRDKAI RAMNNGIALFATEWGS	VNADGNGATDKAETQKNMAFFQKNNI	SHVNWASDKP													
Cl (141)	DDFFRMAELYGDPNMYVIEIYNEPIRQSW	SEVKSATVIAAIRSED PDNLI I VSGPTSWQ	QDV DIASNDPINDNTAYTALH FYAG--	THSQGLRDKAI RAMNNGIALFATEWGS	VNADGNGATDKAETQKNMAFFQKNNI	SHVNWASDKP													
Aa (299)	-----PEGASIVKNGKINGLKNELDTG	VFVKI IKNWSD--NG--NPNSSNGI	INCNTVDCI I NAMQNAKPGNE I I	APGTYTAEKTLDPDNDGKASRFYS	ADGTASKP I IIRGKNASNPPLIKAG	PDONKNDYSIMRLIGDWHI													
As (298)	SNSDPNRTGSSKVLQKGVRLVNNELTP	FGVFKDI IKNWSD--SGNPPPPP	SGTGTIECNSVDCI I IAAQNAQPGDE	ILVAPGTITATDKF--NFGNKAT	TRFGSDKNGTASKP I IIRAKNASNPPLIKAG	PDONKNDYSIMRLIGDWHI													
Tj (293)	-----PEGASIVLKDKGINGLQNDLDT	GTGFKI IKNWSD--NPNSSNGI	INCNTVDCI I NAMQNAKPGNE I I	APGTYTAEKTLDPDNDGKASRFYS	ADGTASKP I IIRGKNASNPPLIKAG	PDONKNDYSIMRLIGDWHI													
Pb (291)	-----PEGASIVNSGKISGLQNDLDT	GTGFKI IKNWSD--NPNSSNGI	INCNTVDCI I NAMQNAKPGNE I I	APGTYTAEKTLDPDNDGKASRFYS	ADGTASKP I IIRAKNASNPPLIKAG	PDONKNDYSIMRLIGDWHI													
Ss (291)	-----AEGASIVNSGKISGLQNDLDT	GTGFKI IKNWSD--NPNSSNGI	INCNTVDCI I NAMQNAKPGNE I I	APGTYTAEKTLDPDNDGKASRFYS	ADGTASKP I IIRAKNASNPPLIKAG	PDONKNDYSIMRLIGDWHI													
Ps (297)	F-----PETGSVQAGQGISGLINDQ	LTTSGQIVKE I I QNDWTTT	TTT--PTTSECTITCIRNAME	TAQAQDEI I IASGTYNFE	DKIV--GAFNRD	OVLYLGSANGSANPI I IIRGASATNP	PVFGIDYTI--DGYLLSIEG												
Oa (297)	F-----PETGSVQAGQGVPLINQNT	DTGFKI I QNDWTTT	TTT--PTTSECTITCIRNAME	TAQAQDEI I IASGTYNFE	DKIV--GAFNRD	OVLYLGSANGSANPI I IIRGASATNP	PVFGIDYTI--DGYLLSIEG												
Fb (299)	-----NEGASIVQPGAGISGLTN	NNRLTKTSGF	IKI IKNWSD--D-DTG--TPPV--	EGPKETCTVETC I IIRAKNAQDEI I	IAPGTYTANDKI--SINGRAT	TRFGSDKNGTASKP I IIRAKNASNPPLIKAG	PDONKNDYSIMRLIGDWHI												
Cl (291)	F-----PETGSVQAGQGVSLINQNT	DTGFKI I QNDWTTT	TTT--PTTSECTITCIRNAME	TAQAQDEI I IASGTYNFE	DKIV--GAFNRD	OVLYLGSANGSANPI I IIRGASATNP	PVFGIDYTI--DGYLLSIEG												
Aa (439)	IKDLLEKSGSKGLVDRSSNSQIVNSV	VDH I GEEG IHLR	GSSNNLVQCGSVYNTG	IKKPGIGEGLYIGSDRKQHNNE--	YNPDCNNNTIDNCI	VGNVTAAGVDK	KEGTNTI I IKNCTFS	SAKGISGENSADAF	IDLKGAYT										
As (444)	LKDLLEKSGSKGLVDRSSNSQIVNSV	VDH I GEEG IHLR	GSSNNLVQCGSVYNTG	IKKPGIGEGLYIGSDRKQHNNE--	YNPDCNNNTIDNCI	VGNVTAAGVDK	KEGTNTI I IKNCTFS	SAKGISGENSADAF	IDLKGAYT										
Tj (433)	VKDLLEKSGSKGLVDRSSNSQIVNSV	VDH I GEEG IHLR	GSSNNLVQCGSVYNTG	IKKPGIGEGLYIGSDRKQHNNE--	YNPDCNNNTIDNCI	VGNVTAAGVDK	KEGTNTI I IKNCTFS	SAKGISGENSADAF	IDLKGAYT										
Pb (430)	IKNLI LLEKSGSKGLVDRSSNSQIVNSV	VDH I GEEG IHLR	GSSNNLVQCGSVYNTG	IKKPGIGEGLYIGSDRKQHNNE--	YNPDCNNNTIDNCI	VGNVTAAGVDK	KEGTNTI I IKNCTFS	SAKGISGENSADAF	IDLKGAYT										
Ss (430)	IKNLI LLEKSGSKGLVDRSSNSQIVNSV	VDH I GEEG IHLR	GSSNNLVQCGSVYNTG	IKKPGIGEGLYIGSDRKQHNNE--	YNPDCNNNTIDNCI	VGNVTAAGVDK	KEGTNTI I IKNCTFS	SAKGISGENSADAF	IDLKGAYT										
Ps (432)	IKDLLEKSGSKGLVDRSSNSQIVNSV	VDH I GEEG IHLR	GSSNNLVQCGSVYNTG	IKKPGIGEGLYIGSDRKQHNNE--	YNPDCNNNTIDNCI	VGNVTAAGVDK	KEGTNTI I IKNCTFS	SAKGISGENSADAF	IDLKGAYT										
Oa (432)	IKDLLEKSGSKGLVDRSSNSQIVNSV	VDH I GEEG IHLR	GSSNNLVQCGSVYNTG	IKKPGIGEGLYIGSDRKQHNNE--	YNPDCNNNTIDNCI	VGNVTAAGVDK	KEGTNTI I IKNCTFS	SAKGISGENSADAF	IDLKGAYT										
Fb (435)	VQNTI LLEKSGSKGLVDRSSNSQIVNSV	VDH I GEEG IHLR	GSSNNLVQCGSVYNTG	IKKPGIGEGLYIGSDRKQHNNE--	YNPDCNNNTIDNCI	VGNVTAAGVDK	KEGTNTI I IKNCTFS	SAKGISGENSADAF	IDLKGAYT										
Cl (426)	IKDLLEKSGSKGLVDRSSNSQIVNSV	VDH I GEEG IHLR	GSSNNLVQCGSVYNTG	IKKPGIGEGLYIGSDRKQHNNE--	YNPDCNNNTIDNCI	VGNVTAAGVDK	KEGTNTI I IKNCTFS	SAKGISGENSADAF	IDLKGAYT										
Aa (579)	FVYRNTFNDRNSVNLASGIDFDRG	TGFTFNFGFNAFDMNTNLG	TAKDQ I PTAARKGGS	PSEI I HWNTNRNPS	IDFP I SDGTENI	VNQCPDWNIE	PCNP I DETAQPT	IFSLP--VNNI	TLVEGY--NLQVEV	NADADGTIDNVKLI									
As (594)	FVYRNTFNDRNSVNLASGIDFDRG	TGFTFNFGFNAFDMNTNLG	TAKDQ I PTAARKGGS	PSEI I HWNTNRNPS	IDFP I SDGTENI	VNQCPDWNIE	PCNP I DETAQPT	IFSLP--VNNI	TLVEGY--NLQVEV	NADADGTIDNVKLI									
Tj (573)	FVYRNTFNDRNSVNLASGIDFDRG	TGFTFNFGFNAFDMNTNLG	TAKDQ I PTAARKGGS	PSEI I HWNTNRNPS	IDFP I SDGTENI	VNQCPDWNIE	PCNP I DETAQPT	IFSLP--VNNI	TLVEGY--NLQVEV	NADADGTIDNVKLI									
Pb (570)	FVYRNTFNDRNSVNLASGIDFDRG	TGFTFNFGFNAFDMNTNLG	TAKDQ I PTAARKGGS	PSEI I HWNTNRNPS	IDFP I SDGTENI	VNQCPDWNIE	PCNP I DETAQPT	IFSLP--VNNI	TLVEGY--NLQVEV	NADADGTIDNVKLI									
Ss (570)	FVYRNTFNDRNSVNLASGIDFDRG	TGFTFNFGFNAFDMNTNLG	TAKDQ I PTAARKGGS	PSEI I HWNTNRNPS	IDFP I SDGTENI	VNQCPDWNIE	PCNP I DETAQPT	IFSLP--VNNI	TLVEGY--NLQVEV	NADADGTIDNVKLI									
Ps (571)	FVYRNTFNDRNSVNLASGIDFDRG	TGFTFNFGFNAFDMNTNLG	TAKDQ I PTAARKGGS	PSEI I HWNTNRNPS	IDFP I SDGTENI	VNQCPDWNIE	PCNP I DETAQPT	IFSLP--VNNI	TLVEGY--NLQVEV	NADADGTIDNVKLI									
Oa (571)	FVYRNTFNDRNSVNLASGIDFDRG	TGFTFNFGFNAFDMNTNLG	TAKDQ I PTAARKGGS	PSEI I HWNTNRNPS	IDFP I SDGTENI	VNQCPDWNIE	PCNP I DETAQPT	IFSLP--VNNI	TLVEGY--NLQVEV	NADADGTIDNVKLI									
Fb (574)	FVYRNTFNDRNSVNLASGIDFDRG	TGFTFNFGFNAFDMNTNLG	TAKDQ I PTAARKGGS	PSEI I HWNTNRNPS	IDFP I SDGTENI	VNQCPDWNIE	PCNP I DETAQPT	IFSLP--VNNI	TLVEGY--NLQVEV	NADADGTIDNVKLI									
Cl (565)	FVYRNTFNDRNSVNLASGIDFDRG	TGFTFNFGFNAFDMNTNLG	TAKDQ I PTAARKGGS	PSEI I HWNTNRNPS	IDFP I SDGTENI	VNQCPDWNIE	PCNP I DETAQPT	IFSLP--VNNI	TLVEGY--NLQVEV	NADADGTIDNVKLI									
Aa (725)	GDQIKGDTSPFFFEYTIIN--	-----AVQGHYSL	TAKATDNDGAKT	SNVTVFKVEDE	QPGCNGFDLAI--	-----SAKIEAE	EYECIMQGI	QTS	TTDI	IGGGVNGWLD	VGDYLYEKI I I	PESEAYKIEYRVASK	DSG	VEIDFR	INDNSDK				
As (742)	DNLVREKESAPYEWGAD--	NANELLG	LPVGT	HAIKVEATDDG	GAKKST--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Tj (718)	NGEKIDEDDLKPYEFESI	SD-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Pb (717)	NNEKLGEDSAPYKISITN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Ss (717)	NEVKLGEDSTPPYKITYTN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Ps (719)	DNNLVQRQINATSYQWHSQ	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Oa (719)	DNNLVQRQINATSYQWHSQ	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Fb (723)	NNQLVRQENTAPYDQDGTPTSD	DELNLGLQ	PGAYTFR	VATD	DDGATAEDT--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Cl (713)	DNNLVQRQINATSYQWHSQ	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Aa (863)	KTSIPNTEGQWNTTII	TKVDLSAQ	QILKLVATGKSW	NIWFKI	TKIDDSGN	PNPN--	NSCNFTPT	SSSLPADK	KASYSNVHLL	TGNGDP	LSNFRFR	FRINWNP	SQNGLYG	FSINT	NSGIPN	YVTLDR	DFMTN	PNSSNP	ISINNSG
As (869)	VNLPV--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tj (830)	ISNLTA--	DOYTI	SVKATD	NGAFSE	DI I IKTVE--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Pb (736)	---AQI--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Ss (736)	---AQI--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Ps (744)	LNGLLE--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Oa (744)	LNGLLE--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Fb (850)	VNGLSV--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cl (738)	LNGLTE--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Aa (1012)	FAGLDGYVWTKKND	FVMVSKTS	FSFYFN	SNIN	VPTE	CGNRD--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
As (999)	LSGWDG	SVWAND	GANFV	MSKDS	SDFS	YIYFS	NSDN	APIC	CAAKSP--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tj (957)	IDRLDG	SVWTKKQNF	FVMSRDK	DTIYFS	NSATK	PNCS	QNEI--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Pb (861)	ISNLDD	SVWAE	NNGNF	FVMSKSG	NFTIY	FNNS	TAP	CNS	VQS--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Ss (861)	ISNLDD	SVWAE	NNGNF	FVMSKSG	NFTIY	FNNS	TAP	CNS	VQS--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Ps (872)	IFNFDG	YVWTS	SDNGNF	FVMSKSN	NFTIY	FNNS	TAP	CNS	VQS--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Oa (872)	IFNFDG	YVWTS	SDNGNF	FVMSKSN	NFTIY	FNNS	TAP	CNS	VQS--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Fb (979)	FNGLDG	YVWTKKND	FVMVSKTS	FSFYFN	SNIN	VPTE	CGNRD--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cl (866)	IFNFDG	YVWTS	SDNGNF	FVMSKSN	NFTIY	FNNS	TAP	CNS	VQS--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Aa (1056)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
As (1043)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tj (1001)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Pb (905)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Ss (905)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Ps (916)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Oa (916)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Fb (1129)	DGSYVWAK	DGNFV	MEKTKG	FTLYFS	NSSL	LAPACS--	NOKTA	IS	QNTG	KARV	YVNP	PNASS	STET	ILDEL	PEKVT	ETB	ISSME	GQRVY	SQKVGK--
Cl (910)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Рис. 2. Выравнивание последовательностей белка из бактерий типа Bacteroidetes. Aa – *Aquimarina aggregata* (WP_099098792.1); As – *Aquimarina spongiae* (WP_073315802.1); Tj – *Tenacibaculum jejuense* (WP_095070691.1); Pb – *Polaribacter butkevichii* (WP_105048247.1); Ss – *Seonamhaeicola* sp. C2-3 (WP_07601600.1); Ps – *Psychroserpens* sp. NJD202 (WP_136584815.1); Oa – *Olleya aquimaris* (WP_116822569.1); Fb – бактерия Flammeovirgaceae KN852 (WP_169684745.1); Cl – *Cellulophaga lytica* (ADY28795.1). Сигнальный пептид ТАТ находится в рамке. Домен GH5 выделен серым цветом; домен PL6 выделен черным цветом; домен TIGR04183 подчеркнут

но не гидролизует МКЦ и ксилан (таблица).

Продуктами гидролиза КМЦ-Na были целлобиоза и целлотриоза, а β -D-глюкан гидролизался до глюкозы, целлобиозы, целлотетрозы и целлопентозы (рис. 4).

Согласно CAZy, ферменты с доменом семейства PL31 обладают активностью глюконо-нан-лазы (КФ 4.2.2.14) или альгинат-лазы (КФ 4.2.2.3). ClGP проявлял активность как в отношении альгиновой кислоты, так и в от-

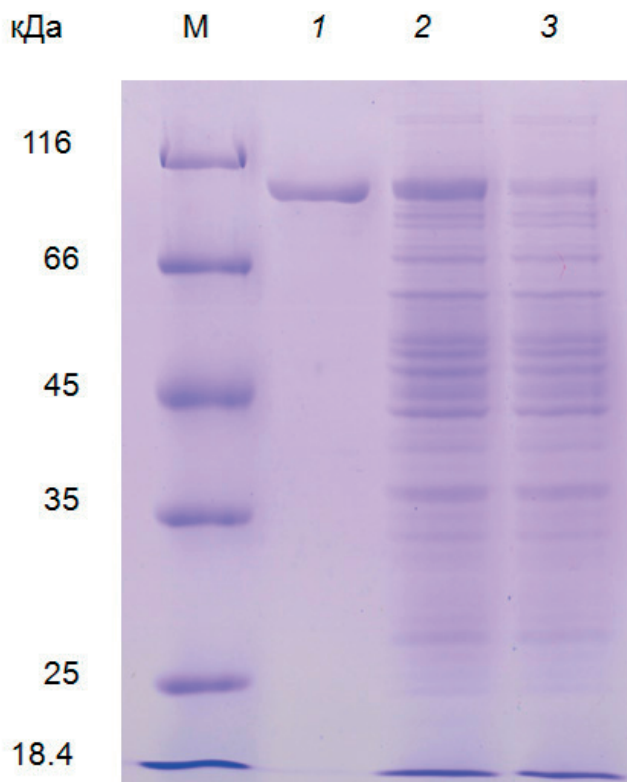


Рис. 3. ДСН-ПААГ-электрофорез CIGP. Дорожки: М – маркеры молекулярной массы; 1 – фермент после очистки; 2 – культура *E. coli* после индукции ИПТГ; 3 – культура *E. coli* до индукции ИПТГ

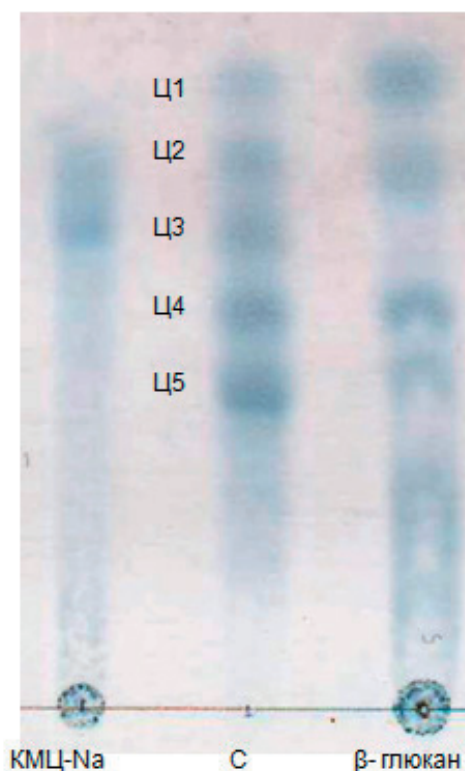


Рис. 4. Продукты гидролиза КМЦ-Na и β-глюкана CIGP, данные ТСХ. С – стандарты: Ц1 – глюкоза, Ц2 – целлобиоза, Ц3 – целлотриоза, Ц4 – целлотетроза, Ц5 – целлопентоза

Субстратная специфичность CIGP

Субстрат	Гидролитическая активность, ед/мг	Лиазная активность, ед/мг
МКЦ	а.о.	—*
β-D-глюкан	2180 ± 104	—
КМЦ-Na	1240 ± 62	—
Аморфная целлюлоза	985 ± 38	—
Ксилан	а.о.	—
Пектин	а.о.	а.о.
Альгиновая кислота	—	240 ± 12
PolyM	—	285 ± 7
PolyG	—	23 ± 1
PolyGlu	—	310 ± 8

Примечание. а.о. – активность отсутствует; * – не определяли.

ношении PolyGlu, поэтому фермент является одновременно глюкуронан-лиазой и альгинат-лиазой. По функциональному признаку в отношении различных блоков альгината лиазы подразделяются на маннуронат-специфичные альгинат-лиазы (PolyM-лиаза, КФ 4.2.2.3)

и гулурилат-специфичные альгинат-лиазы (PolyG-лиаза, КФ 4.2.2.11), а также альгинат-лиазы, активные как в отношении G-, так и в отношении M-блоков [34]. CIGP был активен в отношении PolyM, но проявлял слабую активность в отношении PolyG. Это указывает на то,

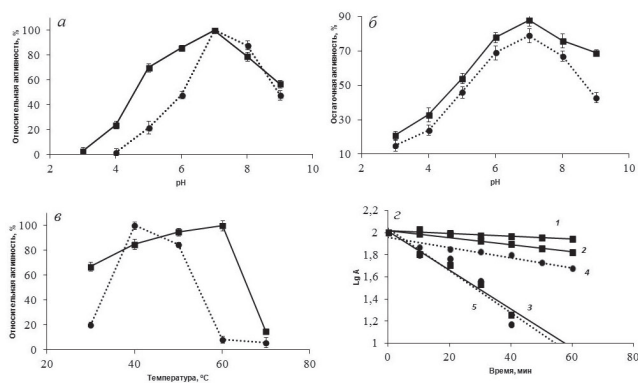


Рис. 5. Свойства гидролитической и лиазной активности ClGP. *a* – pH-зависимость активности; *б* – pH-зависимость стабильности; *в* – зависимость активности от температуры; *г* – термостабильность. Сплошная линия – гидролитическая активность: 1 – 40 °C, $k_{app} = 0,001 \text{ мин}^{-1}$; 2 – 50 °C, $k_{app} = 0,003 \text{ мин}^{-1}$; 3 – 60 °C, $k_{app} = 0,018 \text{ мин}^{-1}$. Пунктирная линия – лиазная активность: 4 – 40 °C, $k_{app} = 0,005 \text{ мин}^{-1}$; 5 – 50 °C, $k_{app} = 0,019 \text{ мин}^{-1}$

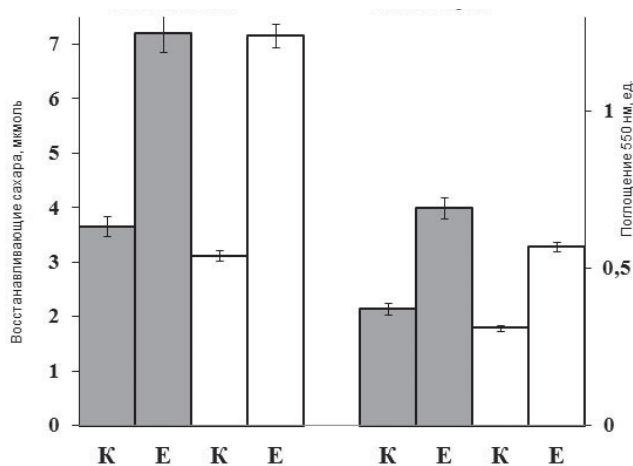


Рис. 6. Осахаривание бурых водорослей рекомбинантным ферментом ClGP. К – контроль; Е – вариант с ферментом. Серые столбики – образование восстанавливающих сахаров, белые столбики – поглощение при 550 нм

что фермент представляет собой PolyM-лиазу. Его слабая PolyG-лиазная активность может быть связана с наличием примесей PolyM-блоков в PolyG в связи со способом приготовления субстратов [18].

Фермент не проявлял лиазной активности в отношении пектина. Чтобы выяснить, трансформируются ли полисахариды при гидролитическом и лиазном расщеплении в различных активных центрах молекулы фермента, мы изучили трансформацию альгиновой кислоты или PolyGlu в присутствии β -D-глюкана. β -D-глюкан в концентрациях 0,5, 1 и 2 мг/мл не влиял на скорость образования ненасыщенного эфи-

ра уроновой кислоты из альгиновой кислоты и PolyGlu. Это показывает, что гидролитическая и лиазная активности ClGP определяются различными активными центрами, что согласуется с наличием доменов GH5 и PL31 в молекуле фермента.

Влияние различных факторов устанавливали отдельно для гидролитической и лиазной активности фермента. pH-Оптимум гидролитической и лиазной активности ClGP был нейтральным (pH 7); при значениях pH ниже 3–4 – активность не наблюдалась (рис. 5).

При нейтральном значении pH стабильность фермента была выше. ClGP обладал умеренной термостабильностью, но его гидролитическая активность проявляла большую устойчивость к высоким температурам, чем лиазная. Гидролитическая активность сохранялась при 50 и 60 °C в течение часа, а лиазная активность исчезала при 50 °C в течение 50 мин. Температурный оптимум для лиазной активности также был ниже и определялся при 40 °C, а для гидролитической активности – при 60 °C. Различия в термооптимуме и термостабильности могут быть результатом различной стабильности доменов GH5 и PL31.

Макроводоросли являются перспективным источником биомассы, пригодной для производства различных химикатов, в том числе биотоплива [35, 36]. Ферментативная обработка увеличивает содержание сахаров в макроводорослях, что увеличивает выход биотоплива при ферментации [37]. В данной работе исследовали способность фермента осаживать две бурые водоросли, *S. latissima* и *L. digitata*. Среди бурых водорослей в Белом море доминируют именно эти два вида – их биомасса может достигать 5,2 кг/м² [38]. При осаживании макроводорослей ClGP образуются редуцирующие сахара и ненасыщенные уроновые кислоты (рис. 6), что может быть связано как с гидролитическим, так и лиазным действием фермента.

Трудно точно оценить вклад гидролитической активности в осаживание, так как при лиазном расщеплении полисахаридов также образуются редуцирующие сахара. Тем не менее фермент эффективно осаживал водоросли. Исходная концентрация редуцирующих сахаров и веществ, а также степень осаживания были выше для *S. latissima*. Это может быть связано с различной концентрацией полисахаридов у водорослей, которая варьируется как в зависимости от вида, так и в зависимости от времени года [39].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В этой работе нами был впервые получен и исследован фермент из *C. lytica*, обладающий как эндоглюканазной, так и альгиназной активностью и, таким образом, относящийся одновременно к двум классам ферментов — гидролазам и лиазам. ClGP проявлял эндоглюканазную активность, как и многие другие белки семейства GH5. Как и большинство известных глюканазсемейства GH5, ClGP эффективно гидролизует β -D-глюкан, аморфную целлюлозу, КМЦ-Na, но не был активен в отношении микрокристаллической целлюлозы [40–42]. Как и в случае ClGP, продукты разложения КМЦ-Na и β -D-глюкана эндоглюканазами GH5 представляют собой олигосахариды [43, 44].

ClGP обладал способностью расщеплять компоненты клеточной стенки водорослей — β -(1,4)-глюканы и альгиновую кислоту. Альгиновая кислота является компонентом клеточной стенки бурых водорослей; это линейный сополимер α -L-гулуруновой кислоты (G) и (1–4)-связанных остатков β -D-маннуруновой кислоты [45]. Она может составлять до 40% от общей сухой массы клеточной стенки [46].

Альгинат-лиазы могут расщеплять альгинат на ненасыщенные олигосахариды уруновых кислот путём β -элиминирования гликозидных связей. Эти ферменты широко распространены в природе и выделены из водорослей, моллюсков и большого числа бактерий [35]. Альгиназы принадлежат к разным семействам PL (<http://www.cazy.org/Polysaccharide-Lyases.html>). Но только единственный фермент — альгиназа PsAly из *Paenibacillus* sp., штамм FPU-7, описанный ранее, принадлежал семейству PL31 [47]. Изучены свойства этого фермента и его трёхмерная структура. Как и полученный нами ClGP, PsAly обладает умеренной термостабильностью, нейтральным оптимумом pH и PolyM-лиазной активностью. Хотя большинство альгиназ имеют нейтральный pH-оптимум, существуют ферменты со щелочным или кислым оптимумом [48].

Поскольку ClGP был также активен против PolyGlu, он обладает глюкуроан-лиазной активностью. PolyGlu, как и альгиновая кислота, представляет собой полиуруновую кислоту, состоящую из мономеров глюкуроновой кислоты [49]. Это вещество содержится в клеточных стенках некоторых бактерий, грибов и зелёных водорослей [16]. Глюкуроан-лиазы секретируются бактериями и грибами и при-

надлежат к разным семействам CAZy (<http://www.cazy.org/Polysaccharide-Lyases.html>). Глюкуроан-лиазная активность показана только для двух белков семейства PL31 [50], но тестирование на активность в отношении альгиновой кислоты в этой работе не проводилось. Фактически в большинстве исследований не проверялась активность альгиназ в отношении PolyGlu или активность глюкуроан-лиаз в отношении альгиновой кислоты. Единственным опубликованным примером альгиназы, проявляющей слабую активность в отношении PolyGlu, является фермент Smlt2602 семейства PL17 из *Saccharophagus degradans* [51]. Было показано, что этот фермент активен против блоков G и M альгината. Одна мутация в активном сайте Smlt2602, H208F, снижала активность альгиназы, но значительно увеличивала активность глюкуроан-лиазы. Возможно, различие в специфичности действия этих ферментов связано с особенностями строения активного центра. Однако не ясно, является ли активность ClGP в отношении этих двух субстратов уникальным свойством или это свойство широко распространено среди других глюкуроан-лиаз и альгиназ. Для выяснения этого вопроса необходимы дальнейшие исследования.

Все белки, наиболее близкие к ClGP и содержащие все 4 домена (TAT, GH5, PL31 и TIGR04183), были идентифицированы с помощью BLASTP у бактерий типа Bacteroidetes; подавляющее большинство видов этих бактерий принадлежит к семейству Flavobacteriaceae, и только один вид принадлежит к более отдалённому семейству Flammeovirgaceae (класс Cytophagia). Все эти бактерии были выделены из различных морских сред, большинство из них принадлежит к «морской кладе» Flavobacteriaceae [52]. Примечательно, что некоторые из них связаны с макроводорослями. Постепенное увеличение числа доступных аннотированных геномов позволяет надеяться, что в ближайшем будущем будут идентифицированы новые белки со схожей доменной структурой.

ClGP представляет собой внеклеточный белок, он имеет N-концевой сигнальный пептид и C-концевой домен TIGR04183 систем транслокации белков TAT и T9SS соответственно. Без делеции N- и C-концевых последовательностей продукции белка не на-

блюдалось. После удаления TIGR04183 и TAT молекулярная масса CIGP уменьшалась с 109,2 до 99,5 кДа. Известно, что эффективность продукции белка у *E. coli* может снижаться с увеличением размера белка [53]. При транслокации через мембрану TAT-сигнальный пептид и домен TIGR04183 удаляются, поэтому зрелые белки их не содержат [30, 54]. Есть данные, что наличие TAT-сигнального пептида может приводить к агрегации и снижению активности рекомбинантных белков [55], а также играть важную роль в правильном фолдинге белков [56]. В нашем случае активный фермент был получен без сигнального пептида TAT и домена TIGR04183. Возможно, что эти структуры не участвуют в сворачивании нативной молекулы CIGP.

Чем выше концентрация сахаров в биомассе водорослей, тем выше выход продукта при ферментации [57]. Существуют различные способы повышения концентрации сахаров в биомассе. Одним из них является физико-химическая обработка: нагревание, кислотный и щелочной гидролиз, обработка микроволнами [58]. Другим способом усиления осахаривания является обработка водорослей ферментами, что является более мягким методом по сравнению с физико-химической обработкой [59, 60]. Для этих целей обычно исполь-

зуются либо альгиназы, либо эндоглюканазы, причём совместное использование этих двух типов ферментов существенно увеличивает образование сахаров [61, 62]. CIGP, обладающий одновременно двумя ферментативными активностями и способный к осахариванию водорослей, может замещать сразу два фермента, и поэтому является перспективным кандидатом для биотехнологического использования.

Вклад авторов. А.В. Лисов, А.А. Леонтьевский — концепция и руководство работой, написание и редактирование текста статьи; Л.И. Трубицина, Т.В. Шушкова, О.В. Белова, Ж.И. Андреева-Ковалевская, И.В. Трубицин — проведение экспериментов; С.С. Киселев — обсуждение результатов исследования, работа с базами данных.

Финансирование. Работа частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 18-07-00899).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gorshkova, T. A., Kozlova, L. V., and Mikshina, P. V. (2013) Spatial structure of plant cell wall polysaccharides and its functional significance, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 836–853, doi: 10.1134/S0006297913070146.
2. Stone, B., Svensson, B., Collins, M., and Rastall, R. (2008) Polysaccharide degradation, in *Fraser-Reid BO* (Tatsuta, K., and Thiem, J., eds) Glycoscience, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 2325–2375.
3. Linhardt, R. J., Galliher, P. M., and Cooney, C. L. (1987) Polysaccharide lyases, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **12**, 135–176, doi: 10.1007/BF02798420.
4. Forsberg, Z., Sørli, M., Petrović, D., Courtade, G., Aachmann, F. L., et al. (2019) Polysaccharide degradation by lytic polysaccharide monooxygenases, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **59**, 54–64, doi: 10.1016/j.sbi.2019.02.015.
5. Baldrian, P., and Valášková, V. (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi, *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**, 501–521, doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00106.x.
6. Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., and Henrissat, B. (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013, *Nucleic Acids Res.*, **42**, D490–D495, doi: 10.1093/nar/gkt1178.
7. Henrissat, B. A. (1991) Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochem. J.*, **280**, 309–316, doi: 10.1042/bj2800309.
8. Chhabra, S. R., Shockley, K. R., Ward, D. E., and Kelly, R. M. (2002) Regulation of endo-acting glycosyl hydrolases in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* grown on glucan- and mannan-based polysaccharides, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 545–54, doi: 10.1128/AEM.68.2.545-554.2002.
9. Yuan, S. F., Wu, T. H., Lee, H. L., Hsieh, H. Y., Lin, W. L., et al. (2015) Biochemical characterization and structural analysis of a bifunctional cellulase/xylanase from *Clostridium thermocellum*, *J. Biol. Chem.*, **290**, 5739–5748, doi: 10.1074/jbc.M114.604454.
10. Tan, H., Miao, R., Liu, T., Yang, L., Yang, Y., et al. (2018) A bifunctional cellulase-xylanase of a new *Chryseobacterium* strain isolated from the dung of a straw-fed cattle, *Microb. Biotechnol.*, **11**, 381–398, doi: 10.1111/1751-7915.13034.

11. Flint, H. J., Martin, J., McPherson, C. A., Daniel, A. S., and Zhang, J. X. (1993) A bifunctional enzyme, with separate xylanase and b(1,3-1,4)-glucanase domains, encoded by the xynD gene of *Ruminococcus flavefaciens*, *J. Bacteriol.*, **175**, 2943-2951, doi: 10.1128/jb.175.10.2943-2951.1993.
12. Holck, J., Djajadi, D. T., Brask, J., Pilgaard, B., Krogh, K. B. R. M., et al. (2019) Novel xylanolytic triple domain enzyme targeted at feruloylated arabinoxylan degradation, *Enzyme Microb. Technol.*, **129**, 109353, doi: 10.1016/j.enzmictec.2019.05.010.
13. Kobayashi, T., Sawada, K., Sumitomo, N., Hatada, Y., Hagihara, H., et al. (2003) Bifunctional pectinolytic enzyme with separate pectate lyase and pectin methylesterase domains from an alkaliphilic *Bacillus*, *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 269-277, doi: 10.1023/A:1023698007103.
14. Johansen, J. E., Nielsen, P., and Sjøholm, C. (1999) Description of *Cellulophaga baltica* gen. nov., sp. nov. and *Cellulophaga fucicola* gen. nov., sp. nov. and reclassification of [*Cytophaga*] *lytica* to *Cellulophaga lytica* gen. nov., comb. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 1231-1240, doi: 10.1099/00207713-49-3-1231.
15. Pati, A., Abt, B., Teshima, H., Nolan, M., Lapidus, A., et al. (2011) Complete genome sequence of *Cellulophaga lytica* type strain (LIM-21), *Stand. Genomic Sci.*, **29**, 221-232, doi: 10.4056/sigs.1774329.
16. Elboutachfai, R., Delattre, C., Petit, E., and Michaud, P. (2011) Polyglucuronic acids: structures, functions and degrading enzymes, *Carb. Polym.*, **84**, 1-13, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.10.063.
17. Domozych, D. (2019) *Algal Cell Walls*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, doi: 10.1002/9780470015902.a0000315.pub4.
18. Haug, A., Larsen, B., and Smidsrød, O. (1966) A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis, *Acta Chem. Scand.*, **20**, 183-190, doi: 10.1016/B978-0-08-011841-3.50043-4.
19. Isogai, A., and Kato, Y. (1998) Preparation of polyuronic acid from cellulose by TEMPO-mediated oxidation, *Cellulose*, **5**, 153-164, doi: 10.1023/A:1009208603673.
20. Jia, X., Chen, Y., Shi, C., Ye, Y., Wang, P., et al. (2013) Preparation and characterization of cellulose regenerated from phosphoric acid, *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 12405-12414, doi: 10.1021/jf4042358.
21. Ghose, T. K. (1987) Measurement of cellulase activities, *Pure App. Chem.*, **59**, 257-268, doi: 10.1351/pac198759020257.
22. Suberkropp, K. (2005) *Pectin-Degrading Enzymes: Polygalacturonase and Pectin Lyase* in Methods to Study Litter Decomposition (Graça, M. A. C., Bärlocher, F., and Gessner, M. O., eds) Springer, Dordrecht, pp. 267-271, doi: 10.1007/1-4020-3466-0_36.
23. Britton, H. T. K., and Robinson, R. A. (1931) Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal, *J. Chem. Soc.*, 1456-1462, doi: 10.1039/JR9310001456.
24. Lisov, A. V., Belova, O. V., Lisova, Z. A., Vinokurova, N. G., Nage, A. S., et al. (2017) Xylanases of *Cellulomonas flavigena*: expression, biochemical characterization, and biotechnological potential, *AMB Express*, **7**, doi: 10.1186/s13568-016-0308-7.
25. Edgar, R. C. (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1792-1797, doi: 10.1093/nar/gkh340.
26. Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A., and Jermini, L. S. (2017) ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates, *Nat. Methods*, **14**, 587-589, doi: 10.1038/nmeth.4285.
27. Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., and Minh, B. Q. (2015) IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies, *Mol. Biol. Evol.*, **32**, 268-274, doi: 10.1093/molbev/msu300.
28. Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., and Vinh, L. S. (2018) UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation, *Mol. Biol. Evol.*, **5**, 518-522, doi: 10.1093/molbev/msx281.
29. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Mol. Biol. Evol.*, **30**, 2725-2729, doi: 10.1093/molbev/mst197.
30. Kulkarni, S. S., Zhu, Y., Brendel, C. J., and McBride, M. J. (2017) Diverse C-terminal sequences involved in *Flavobacterium johnsoniae* protein secretion, *J. Bacteriol.*, **199**, e00884-16, doi: 10.1128/JB.00884-16.
31. Whelan, S., and Goldman, N. (2001) A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach, *Mol. Biol. Evol.*, **18**, 691-699, doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003851.
32. Gu, X., Fu, Y. X., and Li, W. H. (1995) Maximum likelihood estimation of the heterogeneity of substitution rate among nucleotide sites, *Mol. Biol. Evol.*, **12**, 546-557, doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040235.
33. Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H., Himmel, M. E., et al. (2015) Fungal cellulases, *Chem. Rev.*, **115**, 1308-1448, doi: 10.1021/cr500351c.
34. Zhu, B., and Yin, H. (2015) Alginate lyase: review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications, *Bioengineered*, **6**, 125-131, doi: 10.1080/21655979.2015.1030543.
35. Roesijadi, G., Jones, S. B., Snowden-Swan, L. J., and Zhu, Y. (2010). *Macroalgae as a Biomass Feedstock: A Preliminary Analysis*, Pacific Northwest National Lab. (PNNL), Richland, WA (United States), doi: 10.2172/1006310.
36. Fernand, F., Israel, A., Skjermo, J., Wichard, T., Timmermans, K. R., et al. (2017) Offshore macroalgae biomass for bioenergy production: environmental aspects, technological achievements and challenges, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **75**, 35-45, doi: 10.1016/j.rser.2016.10.046.
37. Jung, K. A., Lim, S. R., Kim, Y., and Park, J. M. (2013) Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery, *Bioresour. Technol.*, **135**, 182-190, doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.025.

38. Plotkin, A. S., Railkin, A. I., Gerasimova, E. I., Pimenov, A. Yu., and Sipenkova, T. M. (2005) Subtidal underwater rock communities of the White Sea: structure and interaction with bottom flow, *Russ. J. Mar. Biol.*, **31**, 335-343, doi: 10.1007/s11179-006-0001-9.
39. Schiener, P., Black, K. D., Stanley, M. S., and Green, D. H. (2015) The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*, *J. Appl. Phycol.*, **27**, 363-373, doi: 10.1007/s10811-014-0327-1.
40. Zheng, F., Tu, T., Wang, X., Wang, Y., Ma, R., et al. (2018) Enhancing the catalytic activity of a novel GH5 cellulase GtCel5 from *Gloeophyllum trabeum* CBS 900.73 by site-directed mutagenesis on loop 6, *Biotechnol. Biofuels*, **11**, doi: 10.1186/s13068-018-1080-5.
41. Wang, W., Archbold, T., Lam, J. S., Kimber, M. S., and Fan, M. Z. (2019) A processive endoglucanase with multi-substrate specificity is characterized from porcine gut microbiota, *Sci. Rep.*, **9**, 13630, doi: 10.1038/s41598-019-50050-1.
42. Wu, B., Zheng, S., Pedroso, M. M., Guddat, L. W., Chang, S., et al. (2018) Processivity and enzymatic mechanism of a multifunctional family 5 endoglucanase from *Bacillus subtilis* BS-5 with potential applications in the saccharification of cellulosic substrates, *Biotechnol. Biofuels*, **11**, doi: 10.1186/s13068-018-1022-2.
43. Karlsson, J., Momcilovic, D., Wittgren, B., Schülein, M., Tjerneld, F., et al. (2002) Enzymatic degradation of carboxymethyl cellulose hydrolyzed by the endoglucanases Cel5A, Cel7B, and Cel45A from *Humicola insolens* and Cel7B, Cel12A and Cel45A core from *Trichoderma reesei*, *Biopolymers*, **63**, 32-40, doi: 10.1002/bip.1060.
44. Leis, B., Held, C., Bergkemper, F., Dennemarck, K., Steinbauer, R., et al. (2017) Comparative characterization of all cellulosomal cellulases from *Clostridium thermocellum* reveals high diversity in endoglucanase product formation essential for complex activity, *Biotechnol. Biofuels*, **10**, doi: 10.1186/s13068-017-0928-4.
45. Usman, A., Khalid, S., Usman, A., Hussain, Z., and Wang, Y. (2017) *Algal Polysaccharides, Novel Application, and Outlook*, in *Algae Based Polymers, Blends, and Composites Chemistry, Biotechnology and Materials Science* (Zia, K. M., Zuber, M., and Ali, M., eds) Elsevier, pp. 115-153, doi: 10.1016/B978-0-12-812360-7.00005-7.
46. Rasmussen, R. S., and Morrissey, M. T. (2007) Marine biotechnology for production of food ingredients, *Adv. Food Nutr. Res.*, **52**, 237-292, doi: 10.1016/S1043-4526(06)52005-4.
47. Itoh, T., Nakagawa, E., Yoda, M., Nakaichi, A., Hibi, T., et al. (2019) Structural and biochemical characterisation of a novel alginate lyase from *Paenibacillus* sp. str. FPU-7, *Sci. Rep.*, **9**, 14870, doi: 10.1038/s41598-019-51006-1.
48. Wong, T. Y., Preston, L. A., and Schiller, N. L. (2000) Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications, *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**, 289-340, doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.289.
49. Tavernier, M. L., Delattre, C., Petit, E., and Michaud, P. (2008) b-(1,4)-Polyglucuronic acids — an overview, *Open Biotech. J.*, **2**, 73-86, doi: 10.2174/1874070700802010073.
50. Helbert, W., Poulet, L., Drouillard, S., Mathieu, S., Loiodice, M., et al. (2019) Discovery of novel carbohydrate-active enzymes through the rational exploration of the protein sequences space, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 6063-6068, doi: 10.1073/pnas.1815791116.
51. MacDonald, L. C., Weiler, E. B., and Berger, B. W. (2016) Engineering broad-spectrum digestion of polyuronides from an exolytic polysaccharide lyase, *Biotechnol. Biofuels*, **9**, doi: 10.1186/s13068-016-0455-8.
52. Gavrilidou, A., Gutleben, J., Versluis, D., Forgiarini, F., van Passel, M. W. J., et al. (2020) Comparative genomic analysis of *Flavobacteriaceae*: insights into carbohydrate metabolism, gliding motility and secondary metabolite biosynthesis, *BMC Genomics*, **21**, doi: 10.1186/s12864-020-06971-7.
53. Tsung, K., Inouye, S., and Inouye, M. (1989) Factors affecting the efficiency of protein synthesis in *Escherichia coli*. Production of a polypeptide of more than 6000 amino acid residues, *J. Biol. Chem.*, **264**, 4428-4433, doi: 10.1016/S0021-9258(18)83760-7.
54. Frain, K. M., Robinson, C., and van Dijk, J. M. (2019) Transport of folded proteins by the tat system, *Protein J.*, **38**, 377-388, doi: 10.1007/s10930-019-09859-y.
55. Singh, P., Sharma, L., Kulothungan, S. R., Adkar, B. V., Prajapati, R. S., et al. (2013) Effect of signal peptide on stability and folding of *Escherichia coli* thioredoxin, *PLoS One*, **8**, e63442, doi: 10.1371/journal.pone.0063442.
56. Natale, P., Brüser, T., and Driessen, A. J. (2008) Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane — distinct translocases and mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 1735-1756, doi: 10.1016/j.bbamem.2007.07.015.
57. Adams, J. M., Gallagher, J. A., and Donnison, I. S. (2009) Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments, *J. Appl. Phycol.*, **21**, 569-574, doi: 10.1007/s10811-008-9384-7.
58. Yoo, G., Park, M. S., and Yang, J.-W. (2015) *Chemical Pretreatment of Algal Biomass*, in *Pretreatment of Biomass. Processes and Technologies* (Pandey, A., Negi, S., Binod, P., and Larroche, C., eds) 1st Edn., Elsevier, pp. 227-258, doi: 10.1016/B978-0-12-800080-9.00012-8.
59. Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., and García-González, M. C. (2015) Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production, *Chem. Eng. J.*, **262**, 939-945, doi: 10.1016/j.cej.2014.10.049.

60. Gimpel, J. A., Ravanal, M. C., Salazar, O., and Lienqueo, M. E. (2018) Saccharification of brown macroalgae using an arsenal of recombinant alginate lyases: potential application in the biorefinery process, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 1671-1682, doi: 10.4014/jmb.1805.05056.
61. Manns, D., Nyffenegger, C., Saake, B., and Meyer, A. S. (2016) Impact of different alginate lyases on combined cellulase-lyase saccharification of brown seaweed, *RSC Adv.*, **6**, 45392-45401, doi: 10.1039/C6RA06669K.
62. Manns, D., Nyffenegger, C., Saake, B., and Meyer, A. S. (2016) Brown seaweed processing: enzymatic saccharification of *Laminaria digitata* requires no pre-treatment, *J. Appl. Phycol.*, **28**, 1287-1294, doi: 10.1007/s10811-015-0663-9.

MULTIFUNCTIONAL ENZYME WITH ENDOGLUCANASE AND ALGINASE/GLUCURONAN LYASE ACTIVITIES FROM BACTERIUM *Cellulophaga lytica*

A. V. Lisov^{1*}, S. S. Kiselev², L. I. Trubitsina¹, O. V. Belova¹,
Z. I. Andreeva-Kovalevskaya¹, I. V. Trubitsin¹, T. V. Shushkova¹, and A. A. Leontievsky¹

¹ Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences",
G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: ssl208@rambler.ru

² Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences",
Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

Cellulophaga lytica is a gram negative aerobic bacterium, in the genome of which there are many genes encoding polysaccharide degrading enzymes. One predicted enzyme contains a glycoside hydrolase (GH) domain from the GH5 family and a polysaccharide lyase (PL) domain from the PL31 family. The enzyme also contains the TAT signal peptide and TIGR04183 domain, which indicates the extracellular nature of the enzyme. The enzyme was named CIGP. Phylogenetic analysis showed that the enzymes, which were most closely related to CIGP and contained all four domains (TAT, GH5, PL31, TIGR04183), are widespread among bacterial species belong to the Flavobacteriaceae family. CIGP was expressed in *E. coli*, purified, and its properties were studied. CIGP showed endoglucanase (EC 3.2.1.4) activity and catalyzed the hydrolysis of β -D-glucan, carboxymethylcellulose sodium salt (CMC), amorphous cellulose, but not microcrystalline cellulose and xylan. The products of CMC hydrolysis were cellobiose and cellotriose, while β -D-glucan was hydrolyzed to glucose, cellobiose, cellotetraose, cellopentaose. CIGP was more active against poly β -D-mannuronate blocks than poly α -L-guluronate blocks of alginic acid. This indicates that the enzyme is a polyM lyase (EC 4.2.2.3). CIGP was active against polyglucuronic acid, so it showed glucuronan lyase (EC 4.2.2.14) activity. The enzyme had a neutral pH optimum, was more stable at neutral pH values and had a moderate thermal stability. CIGP effectively saccharified two brown algae, *Saccharina latissima* and *Laminaria digitata*, which indicates the possibility of using the enzyme for saccharification of macroalgae used for biofuel production.

Keywords: GH5 endoglucanase, PL31 alginase, multifunctional enzyme, saccharification of macroalgae

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

1. Общие положения

1.1. Ежемесячный международный журнал «Биохимия»/Biochemistry (Moscow), учреждением которого является Российская академия наук, издается и распространяется одновременно на русском и английском языках.

1.2. Журнал «Биохимия» публикует работы по всем разделам биохимии, а также концептуально важные работы по биохимическим аспектам смежных областей (молекулярной биологии, биофизики, биоорганической химии, микробиологии, иммунологии, физиологии, нейробиологии, геронтологии, биомедицинских наук и др.), направленные на понимание молекулярных и клеточных основ биологических процессов. В журнале печатаются описания новых экспериментальных методик в области биохимии, теоретических достижений, имеющих значение для биохимии, а также обзоры современных биохимических тем исследования и мини-обзоры. **Журнал не рассматривает** чисто феноменологические работы, которые описывают изменения биохимических параметров или маркеров биологических процессов без связи с механизмами, вызвавшими эти изменения или являющимися следствием таких изменений, а также работы по клонированию и экспрессии (в том числе в трансгенных животных и растениях) индивидуальных генов и материалы по анализу геномных полиморфизмов.

1.3. К публикации принимаются законченные оригинальные работы, содержащие новые экспериментальные результаты; методические работы, включающие описание новых методов биохимических исследований; материалы теоретического характера с изложением новых принципов, подходов для решения тех или иных биохимических задач. Не принимаются статьи с результатами, новизна которых заключается только в том, что изучаемый хорошо известный объект получен из другого источника.

Раздел «**Краткие сообщения**» публикует короткие экспериментальные статьи заявочного, приоритетного характера, требующие скорейшей публикации. В сопроводительном письме в редакцию авторам следует мотивировать необходимость ускоренного прохождения материала. Срок публикации таких сообщений 1–2 месяца.

Журнал печатает заказанные редколлегией (или предлагаемые авторами и одобренные редколлегией) **обзоры** по наиболее актуальным проблемам биохимии и смежных наук. К обзорным статьям предъявляются следующие требования: 1) у авторов должны быть свои работы по теме обзора; 2) список цитированной литературы должен включать работы, опубликованные по данной теме в течение последних 5 лет; 3) обзор не должен быть пересказом и подчас дословным цитированием кусков ранее опубликованных работ, в нем должен быть критический разбор цитируемых материалов и своя концепция, свое видение проблемы, побудившее авторов написать данный обзор. Редакция и рецензенты строго следят за плагиатом.

Раздел «**Дискуссии**» предоставляет авторам возможность опубликовать комментарии, критические замечания и иные соображения по поводу напечатанных ранее на страницах журнала работ, выступить с новой гипотезой. Раздел носит полемический характер и печатает ответные реплики затронутых в публикациях сторон.

1.4. Журнал индексируется и включен в библиографические базы данных Web of Sciences, Biochemistry and Biophysics Citation Index, Biological Abstracts, BIOSIS Database, Chemical Abstracts, Chemical Titles, Current Contents/Life Science, Excerpta Medica, Index Internacional de Cardiologia, Index Medicus (MEDLINE/Pubmed), International Abstracts of Biological Sciences, The ISI Alerting Service, Science Citation Index, Science Citation Index Expanded, SCOPUS, Compendx; РИНЦ. Журнал включен в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК.

1.5. Правила для авторов и информацию о журнале можно найти на сайтах журнала:

<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>

<https://biochemistrymoscow.com>,

а также на порталах издательств Pleiades

<https://pleiades.online/ru/journal/biochmsc/>

и Springer

<https://link.springer.com/journal/10541>.

На сайте журнала на английском языке представлены содержания всех выпусков, начиная с 1996 г., с резюме статей, ключевыми словами и адресами авторов, а также в полном объеме — тематические выпуски журнала, посвященные наиболее актуальным проблемам биохимии.

1.6. Импакт-фактор Biochemistry (Moscow) в 2020 г. составил 2.487, импакт-фактор РИНЦ для «Биохимии» — 3.038. По данным Scopus, журнал находится во 2-й квартили (Q2) среди журналов медико-биологического профиля.

1.7. Для увеличения охвата читательской аудитории и повышения цитируемости своей работы вы можете опубликовать статью в Biochemistry (Moscow) в режиме открытого доступа (Open Access). Вся информация о публикации статьи в свободном доступе можно найти на сайте издательства:

<http://pleiades.online/ru/authors/openaccess/> или обратившись в редакцию.

2. Порядок подачи рукописей

2.1. Редакция принимает на рассмотрение рукописи, присланные по электронной почте в форме присоединенных файлов (attachment) на адреса редакции:

editorial@biochemistrymoscow.com

ozrina@bio.chem.msu.ru,

а также поданные через Авторский портал издательства:

<https://publish.sciencejournals.ru>.

2.2. Материал статьи — текст, включая резюме на русском и английском языках, список литературы, рисунки с подписями и таблицы — оформляется одним файлом; каждый рисунок дополнительно оформляется отдельным файлом. Если пересылаемый материал велик по объему, следует использовать программы для архивирования.

Все страницы рукописи, в том числе содержащие список литературы, таблицы и подписи к ним, следует пронумеровать; строки также следует последовательно пронумеровать.

На отдельной странице прилагаются сведения об авторах с указанием адресов, контактных телефонов, факса и электронной почты, а также указывается автор, ответственный за переписку с редакцией и работу с корректурой.

2.3. Одновременно с русским желательно представить аутентичный английский вариант рукописи.

2.4. При подаче рукописи авторам следует прислать в редакцию **сопроводительное письмо**, в котором надо указать, что: 1) представленный материал (или его части) не был ранее нигде опубликован и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях; 2) авторы ознакомились с этическими

нормами, предписанными международными соглашениями о публикациях научных статей, и соблюдают их; 3) авторами представлена информация о потенциальных конфликтах интересов; 4) авторы ознакомились с правилами проведения исследований с участием человека и/или животных и соблюдают их; 5) каждый соавтор сообщает о своем согласии на авторство в статье (см. соответствующие Положения на сайтах журнала и на порталах Springer и Pleiades).

3. Требования к оформлению рукописей

3.1. Текст статьи должен быть изложен по возможности сжато и тщательно отредактирован, но без ущерба для ее понимания и воспроизведения результатов.

3.2. Рукопись должна быть построена следующим образом: 1) индекс УДК; 2) заглавие; 3) инициалы и фамилии авторов; 4) полные названия учреждений, индекс, город и электронная почта (аффилиация); 5) резюме на русском языке; 6) ключевые слова; 7) краткое заглавие статьи (колонтитул); 8) текст статьи, включающий список цитированной литературы, таблицы, подписи к рисункам; 9) резюме на английском языке (с переводом названия статьи, фамилий авторов, аффилиации и ключевых слов).

Индекс УДК (уникальной десятичной классификации) выделяется *курсивом* и ставится в верхнем левом углу первой страницы.

Заглавие должно быть максимально кратким, информативным и без сокращений.

Если авторы статьи являются сотрудниками разных учреждений, то учреждения следует пронумеровать и после каждой *фамилии* надстрочным знаком указать соответствующий номер; звездочкой справа от цифры необходимо отметить автора, ответственного за переписку с редакцией. Для каждого из авторов приводится полное название учреждения с индексом, городом и страной; для автора, ответственного за переписку, указывается также адрес электронной почты. Авторы, внесшие равный вклад в работу, обозначаются знаком решетки (#).

Резюме должно быть кратким (не более 250 слов), сжато и ясно описывающим основные конкретные результаты работы и вытекающие из них выводы.

Ключевых слов — не более 15.

При использовании нестандартных сокращений должен быть добавлен раздел *Принятые сокращения*.

Текст экспериментальной статьи следует разбить на разделы: 1) Введение, 2) Материалы и методы, 3) Результаты исследования, 4) Обсуждение результатов (объединенный раздел «Результаты и их обсуждение» допускается в тех случаях, когда обсуждение невелико по объему), 5) Заключение, 6) Список литературы, 7) Резюме на английском языке.

Во *введении* кратко излагается история вопроса с обязательным рассмотрением работ, в которых аналогичные или близкие исследования уже проводились, и формулируется цель исследования.

Основное требование к изложению *методов исследования* состоит в том, чтобы процедуры были описаны максимально кратко, но по описанию можно было воспроизвести эксперименты; сюда же должны быть включены использованные в работе материалы, реактивы и приборы с указанием фирмы и страны-производителя, например: глицерин («Sigma-Aldrich», США), электронный микроскоп JEM 100C («JEOL», Япония). Только новые методы следует детально описывать; на ранее опубликованные и общеизвестные — достаточно сослаться в списке литературы, указав автора и/или название метода (например, концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [7]). Если метод известен не слишком широко, желательно изложить его принцип и указать автора. **Не допускаются** ссылки на методы по типу «нуклеазу измеряли методом [7]» или «по [7]» (ссылка не может быть самостоятельным членом предложения).

Результаты исследования обычно представлены рисунками и таблицами; те эксперименты, которые не нуждаются в документации, описываются в тексте. В этом разделе не следует приводить обсуждение результатов, можно ограничиться объяснением причинно-следственных связей между описываемыми экспериментами.

Раздел «*Обсуждение результатов*» должен содержать интерпретацию результатов (но не их повторение) и сравнение с ранее опубликованными результатами. Желательно основные результаты иллюстрировать простой и наглядной схемой.

В случае необходимости рукопись завершается *заключением*, которое отделяется от раздела «Обсуждение результатов» отбивкой.

В связи с участием журнала в Международном комитете по этике публикаций (Committee on Publication Ethics — COPE) авторам следует внести в конце статьи несколько фраз, демонстрирующих приверженность международным этическим стандартам. Ниже приведены образцы представления соответствующих разделов в заключительной части статьи.

1) Следует описать вклад каждого из авторов в работу и подготовку рукописи (раздел «Вклад авторов»). Например: А.Б. Иванов и В.Г. Петров — концепция и руководство работой; Д.Е. Сидоров и З.И. Дроздов — проведение экспериментов; А.Б. Семенов и В.Г. Петров — обсуждение результатов исследования; С.И. Холодов и В.Г. Антонов — написание текста; А.Б. Иванов, В.Г. Петров, А.Б. Семенов — редактирование текста статьи.

2) Если работа выполнена при поддержке какой-либо организации, в разделе «Финансирование» следует указать, каким фондом и грантом поддержано данное исследование и каждая часть работы в отдельности, если источники финансирования разные. Следует приводить полные названия институтов и организаций-спонсоров.

3) В разделе «Благодарности» по желанию авторов сообщается информация о любой помощи в проведении работы и подготовке статьи: о полезных обсуждениях и дискуссиях, благодарности коллегам; о предоставлении материалов, научных данных, компьютерного оборудования, приборов; о проведении исследований в центрах коллективного пользования; о помощи в технической подготовке текста.

4) В разделе «Конфликт интересов» авторы заявляют о наличии или отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере. Данный раздел является обязательным.

5) Обязательным является также раздел «Соблюдение этических норм». Если исследования проводились на животных, то в данном разделе указывается: «Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций». Если исследования проводились с участием людей, то в разделе «Соблюдение этических норм» указывается: «Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по иссле-

довательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие». Если в статьях не содержится описания исследований с участием людей или использованием животных и выполненных кем-либо из авторов, в разделе «Соблюдение этических норм» указывается: «Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов».

б) Если статья содержит персональную информацию об участниках исследования, то необходимо включить следующее положение в раздел «Информированное согласие»: «От всех участников, чья персональная информация содержится в этой статье, получено дополнительное письменное добровольное согласие».

Список цитируемой литературы должен быть максимально кратким (не более 150 ссылок), но содержащим ссылки на все принципиально важные последние публикации по данному вопросу. В журнале принята последовательная нумерационная система цитирования, т.е. по ходу изложения указывается порядковый номер процитированного источника (в квадратных скобках), соответствующий номеру в Списке литературы. Авторам следует очень внимательно проверить последовательность нумерации ссылок в тексте и соответствие номера каждой ссылки в тексте и списке литературы. *Не допускается* включение в список литературы ссылок на веб-сайты, необходимо ссылаться на публикации авторов, предлагающих эти электронные ресурсы (программы/базы данных). Если такие публикации отсутствуют, ссылка дается в тексте так же, как на другие неопубликованные материалы (например, База данных структур бактериальных углеводов, <http://csdb.glycoscience.ru/bacterial>).

Ссылки на **неопубликованные** данные не допускаются. Можно сослаться на личное сообщение кого-либо, в таком случае необходимо указать инициалы и фамилию источника, а также место работы.

Следует избегать появления **дублированных** ссылок в списке литературы, а также ссылок на **отозванные** статьи.

Список литературы печатается как отдельный раздел рукописи с указанием фамилий и инициалов всех авторов, названия цитируемой

статьи и выходных данных. Кроме этого, желательно дать doi статьи. Ниже приводятся примеры ссылок на журналы, книги, сборники, диссертации.

1. Beltrami, C., Besnier, M., Shantikumar, S., Shearn, A. I. U., Rajakaruna, C., et al. (2017) Human pericardial fluid contains exosomes enriched with cardiovascular-expressed microRNAs and promotes therapeutic angiogenesis, *Mol. Ther.*, **25**, 679-693, doi: 10.1016/j.ymthe.2016.12.022.
2. Tran, Q. M., Fong, C., Rothery, R. A., Maklashina, E., and Cecchini, G. (2012) Out of plane distortions of the heme *b* of *Escherichia coli* succinate dehydrogenase, *PLoS One*, **7**, e32641, doi: 10.1371/journal.pone.0032641.
3. Анисимов В. Н. (2008) *Молекулярные и физиологические механизмы старения*, Наука, СПб.
4. Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
5. Tanphaichitr, V. (2001) in *Handbook of Vitamins* (Rucker, R., and Suttie, J., eds) Marcell Dekker, N.Y., pp. 275-316.
6. Гендролис А. А., Серебрянников Н. В., Гандель В. Г. (1978) В кн. *Простагландины* (под ред. Ажгихина И.С.) Медицина, Москва, с. 332-347.
7. Гандельман О. А. (1992) *Кинетика и механизм биoluminesцентного окисления люциферина светляков*. Дис. канд. хим. наук, МГУ, Москва.
8. Rosenkranz, A. A., Slastnikova, T. A., Durymanov, M. O., and Sobolev, A. S. (2013) Malignant melanoma and melanocortin 1 receptor, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1228-1237, doi: 10.1134/S0006297913110035.

Для авторов, использующих систему EndNote, редакция предоставляет стиль, который поддерживает форматирование цитат в тексте и список литературы. Стилевой файл можно найти на сайтах журнала:

<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>
<https://biochemistrymoscow.com>

в разделах для авторов.

В конце статьи дается *резюме на английском языке*, являющееся аутентичным переводом заглавия статьи, инициалов и фамилий авторов в английской транскрипции, названий учреждений с индексами, названиями городов и адресами электронной почты, текста аннотации и ключевых слов.

3.3.1. Объем экспериментальной статьи, включая список литературы, таблицы, рисунки (3 рисунка считаются за 1 страницу) и подписи к ним, резюме на английском языке, не должен превышать 20 машинописных страниц, количество рисунков — не более 8; **краткое сообщение** — не более 12 страниц (включая

не более 4 рисунков и/или таблиц); **мини-обзор** — не более 16 страниц (включая не более 5 рисунков); **обзор** — не более 35 страниц (включая не более 8 рисунков); сообщения в разделе «Дискуссии» — до 4 страниц.

3.3.2. Текстовые файлы следует представлять в формате Microsoft Word (версия 6.0 и более поздние), шрифты для основного текста — Times New Roman, размер букв 12, полтора интервала, в одну колонку без выравнивания по правому краю, без переноса слов, с полями 3 см с левой стороны, на странице — не более 30 строк.

Для оформления текста можно использовать курсив, полужирные начертания, подстрочные и надстрочные индексы, греческие и математические символы (шрифт Times New Roman) в соответствии со стилевым оформлением журнала.

Стиль оформления текстового материала должен быть простым: **без запрограммированных заголовков, вставок, шаблонов, ссылок на литературные источники (гиперссылок)**; без увеличения межстрочных и межбуквенных интервалов; без использования шаблонов — в окне «стиль» должно быть «обычный». Особенно это относится к «Списку литературы», т.к. запрограммированные порядковые номера при переносе в издательскую программу исчезают.

Авторы не должны использовать такие функции программы Word, как «Закладка», «Примечание», «Сноска», «Концевая сноска», потому что они неправильно интерпретируются издательской программой. Если в тексте встречается сноска (или концевая сноска), то сразу после предложения или абзаца с ее номером, следует набрать «{Footnote}», т.е. «{Сноска}», и далее непосредственно текст сноски.

Если при подготовке статьи была использована функция «Рецензирование», то перед сохранением файла нужно отменить функцию «Рецензирование» и затем использовать функцию «Принять все изменения в документе».

Таблицы следует приводить в тех случаях, когда данные не могут быть приведены в тексте. Каждая таблица оформляется на отдельной странице и имеет свой заголовок. Колонки в таблице должны быть озаглавлены с указанием через запятую размерности приводимых величин. Необходимо стремиться к максимальной краткости заголовков колонок, не давать величин, легко выводимых из имеющихся (например, разность или проценты). Повторение одних и тех же данных в тексте, в таблицах или

на рисунках не допускается. Таблицы принимаются только в формате Word (doc, docx). Если таблицы содержат графические вставки, эти вставки следует прислать в виде отдельных графических файлов высокого качества.

3.3.4. Рисунки с подрисовочными подписями следует располагать в тексте по месту ссылки на каждый рисунок. Кроме того, рисунки должны быть представлены в виде отдельных файлов, удовлетворяющих следующим требованиям:

— для схем и графиков **без полутоновых вставок**: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в черно-белом режиме (Line-art, Black-and-White, Bitmap). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg;

— для **полутоновых рисунков** или графиков **с полутоновыми вставками**: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в полутоновом черно-белом режиме (градации серого — Grayscale). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg;

— для **цветных рисунков**: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в цветном режиме CMYK (для цветной печати), RGB (для цветных рисунков в электронной версии). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg;

— независимо от типа графики, рисунок должен обладать **высоким реальным разрешением**: не ниже 300 dpi для полутоновых иллюстраций; не ниже 600 dpi для штриховых и смешанных (полутоновых/штриховых) иллюстраций. Пикселизация изображений в форматах растровой графики не должна быть грубой. Линии рисунков должны быть толщиной не менее 3 пунктов (point). Следует избегать чрезмерно мелких обозначений (букв, цифр, значков и т.д.). Пикселизированные (растровые) рисунки не следует вставлять в документ Word или переводить в формат pdf, так как это ухудшает их качество;

— рисунки должны иметь размеры, соответствующие их информативности. Размер рисунка на одну колонку не должен быть менее 8 см; на две колонки — менее 17 см. Рисунки не должны быть чрезмерно крупными;

— векторные иллюстрации не должны содержать точечных закрасок, таких как «Noise», «Black & White noise», «Top noise». Для векторной графики все использованные шрифты должны быть включены в файл;

— шрифты внутри рисунков выбираются из гарнитуры Arial размером 9 пунктов;

— следует избегать сканирования рисунков из книг и других печатных изданий, так как

такие файлы дают низкое качество при печати и имеют неоправданно большой размер.

Общие требования к подготовке графиков, диаграмм и формул:

— **график** должен содержать обозначения координатных осей (измеряемый параметр и единица измерения), а также кривых и других деталей. Надписи по осям выполняются вдоль осей шрифтом Arial с заглавной буквы, единица измерения отделяется запятой, а не скобками (например, Объем элюента, мл). Линии внутри рисунка следует пронумеровать (цифры выполняются *курсивом* — 1, 2 и т.д.), и в подрисуночной подписи (не на рисунке) дать пояснения к каждой линии. Экспериментальные точки предпочтительно представлять заштрихованными и незаштрихованными кружками, квадратами, треугольниками, ромбами. Отдельные кривые могут различаться также сплошным или штриховым изображением. Все линии должны быть изображены четко с толщиной линий (обычно 3 пункта), позволяющей уменьшить рисунок до конечного размера в журнале. Координатные оси в большинстве случаев необходимо отображать черными (не серыми) линиями. Фон графика или диаграммы должен быть белым, без линий координатной сетки (за исключением случаев, когда иной цвет фона или наличие сетки необходимы для правильного восприятия);

— на **диаграммах** и **фотографиях** отдельные элементы (столбцы, дорожки геля и пр.) следует пронумеровать *курсивными* арабскими цифрами (1, 2 и т.д.) и в подрисуночной подписи (не на рисунке) дать пояснения к каждой цифре. Если помимо арабских требуется введение римских цифр (I, II, III и т.д.), эти цифры должны быть прямого начертания;

— если рисунок состоит из нескольких частей (диаграмм, графиков, схем, структур белков, фотографий, в т.ч. электрофореграмм), их нужно обозначить строчными *курсивными* буквами (a, b, в и т.д.) гарнитурой Times, размером большим, чем основной текст, и поместить эти буквы в верхних левых углах соответствующих частей. В подрисуночной подписи следует дать пояснение к каждой части рисунка;

— для написания **химических формул** в тексте используется программа ChemWindows;

— длинные и сложные **математические формулы** следует представлять в виде рисунков без подписей в одном из допустимых форматов (pdf, tiff или jpg). Каждую формулу нужно дать отдельным файлом, название которого соответствует номеру формулы; при подготовке

данных файлов следует руководствоваться правилами подготовки графических материалов. Функцией «Редактор уравнений» надо пользоваться **только для развернутых уравнений** (как нумерованных, так и встречающихся в тексте), но не для небольших выражений (обозначений), вкрапленных в текст, например, ΔG , $T\Delta S$, K_m . (Для таких небольших выражений должны использоваться основные функции программы Word, как и для всего остального текста статьи.) Для выражений, в которых требуется «кернинг» (нижний и верхний индексы, расположенные один под другим), надо использовать только надстрочные и подстрочные знаки (например, NH_3^+), а «кернинг» будет выполнен макетчиком. Эти требования обусловлены тем, что издательская программа неправильно воспринимает данные, полученные с помощью функции «Редактор уравнений»;

— в ширину формула не должна превышать 8,5 см (ширина колонки журнала). Более длинные формулы должны быть разбиты автором на несколько строк. Формулы должны быть набраны шрифтом Times New Roman. В случае если формулы предоставляются в виде пикселизованных (растровых) изображений, они должны быть представлены в черно-белом режиме (Line-art, Black-and-White, Bitmap) в формате tiff или jpg. Такие изображения должны обладать **высоким реальным разрешением** (пикселизация не должна быть грубой). Особое внимание следует уделять качеству графической передачи надписей, цифр и мелких элементов пикселизованного изображения. Пикселизованные (растровые) изображения не стоит вставлять в документ Word или переводить в формат pdf, так как это зачастую ухудшает их качество;

— **аминокислотные, нуклеотидные и пр. последовательности** часто изображаются в форме, требующей строго вертикального расположения компонентов. Поэтому во избежание ошибок и необходимости проверять большие количества сложной информации авторы должны представлять в редакцию материалы такого рода в виде, пригодном для репродукции.

Обращаем внимание на общие условия публикации иллюстраций:

— надписи и обозначения на рисунках могут меняться в русской и английской версиях при переводе, поэтому для фотографий и рисунков, где надписи наложены на сложный, неоднотонный фон, желательно предоставить второй вариант без текста и всех обозначений,

для остальных иллюстраций — располагать надписи на иллюстрации так, чтобы они не соприкасались с другими ее частями. Авторы также могут сами подготовить версии рисунков с английскими надписями;

— рисунок должен иметь заголовок и информативную подрисуночную подпись, делающую его смысл понятным без обращения к тексту — указываются условия, специфические для данного эксперимента; ссылки на основной текст допускаются только чтобы избежать повторов и неясностей;

— цветные иллюстрации публикуются **бесплатно для авторов** в том случае, если они будут размещены **только в электронной версии статьи**, а в печатной версии журнала они будут в черно-белом исполнении. При этом авторы должны иметь в виду, что в печатной версии с черно-белыми рисунками сохраняются подрисуночные подписи из цветной электронной версии, поэтому следует избегать указаний на цвет в подрисуночных подписях. Авторам необходимо подбирать цвета таким образом, чтобы при черно-белой печати не утратилась информативность. Цветные линии графиков желательно размечать обозначениями, цифрами или спецсимволами или делать различающиеся типы линий для каждого цвета. Цветные области на иллюстрациях желательно размечать различающимися обозначениями или спецсимволами, а не одинаковыми символами разных цветов. Если цветовое разделение областей находится примерно в одном цветовом тоне, то желательно провести тонкую линию границы между ними. При большом количестве цветных областей в схожих цветовых тонах желательно дополнительно обозначить области символами или штриховкой. Все надписи и обозначения желательно делать не цветными, а черными или белыми, в зависимости от подложки;

— если электронная версия статьи содержит несколько цветных рисунков, в печатной версии возможна платная публикация всех этих рисунков в цвете либо бесплатная публикация всех этих рисунков в черно-белом исполнении. Публикация в печатной версии только части цветных рисунков в цветном исполнении невозможна;

— подготовленные рисунки желательно распечатать, чтобы убедиться, что они хорошо выглядят в напечатанном виде: все элементы рисунка должны быть хорошо видны на распечатке, фон должен быть чистым, надписи и цифры должны легко читаться. Зачастую

бывает достаточно сложно оценить качество рисунка только по тому, как он выглядит на экране компьютера;

— если авторы используют в своей рукописи иллюстрации или таблицы из других публикаций (в том числе своих собственных), то им необходимо запросить у правообладателей этих публикаций разрешение на перепечатку или использование материалов.

Несоблюдение правил подготовки графического материала приводит к необходимости переработки рисунков авторами и задержке публикации рукописи.

3.3.5. Дополнительные материалы к статьям.

Для более полного описания исследования к статье могут прилагаться дополнительные материалы (аудио- и видеофайлы, презентации, дополнительные таблицы, рисунки и пр.) при условии, что автор является правообладателем данных материалов и автором ранее не были переданы авторские права на их использование иным (кроме издателя) лицам либо автор имеет письменное разрешение правообладателя на их использование в целях опубликования и распространения в журнале. Дополнительные материалы должны быть законченным произведением. Не допускается выносить в дополнительные файлы материалы, критически важные для понимания статьи. Дополнительные материалы не правятся и не обрабатываются, публикуются в исходном авторском исполнении. Файлы дополнительных материалов должны именоваться по порядку, например, «ESM_1.jpg», «ESM_2.pdf», «ESM_3.xls». В тексте статьи должна быть указана ссылка на наличие дополнительных материалов («...дополнительные данные приведены в Online Resource 1», «...как показано в таблице Online Resource 2»). Дополнительные материалы являются частью статьи, на которую распространяются все правила и требования, предъявляемые к основному тексту. Дополнительные материалы публикуются только в электронной версии журнала на сайтах:

<https://www.springer.com>,

<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>,

<https://biochemistrymoscow.com>.

3.3.6. Все физические величины рекомендуется приводить в Международной системе СИ.

3.3.7. Физико-химические символы в тексте, структурные формулы органических соединений и математические формулы должны быть набраны на компьютере. В буквенных обозначениях отношений единиц в качестве знака деления следует применять косую черту, например,

моль/с (моль в секунду). В более сложных выражениях одновременно с косой чертой применяются скобки, чтобы избежать двусмысленности: $a/(bc)$, но не $a/b/c$ или a/bc ; $(a/b)c$, но не $a/b \cdot c$. Отношения можно также представить в виде произведения символов единиц, возведенных в степень (положительную и отрицательную), например, моль $\cdot$ с⁻¹. Не допускаются выражения типа мА/гель, мкмоль/мин $\cdot$ мг белка и т.п. В таких случаях следует писать: мА на 1 столбик геля, мкмоль/мин на 1 мг белка и т.п.

3.3.8. При подготовке статьи необходимо учесть **правила использования символов, сокращений, условных обозначений** и пр., рекомендованные Комиссией по биохимической номенклатуре Международного союза биохимии и молекулярной биологии (<https://iubmb.org>).

3.3.9. Номенклатура веществ, меченных изотопами. Символ изотопа помещается в квадратных скобках перед названием соединений (без пробела): [¹⁴C]мочевина, [α -¹⁴C]лейцин, L-[метил-¹⁴C]метионин. Если соединение содержит больше одного атома изотопа, и позиция этих атомов не указывается, то число атомов изотопа обозначается подстрочным индексом справа от символа: [¹⁴C]₂гликолевая кислота. Символом U обозначается равномерное распределение метки: запись [U-¹⁴C]глюкоза означает, что изотоп ¹⁴C распределен равномерно между всеми шестью положениями. Символ G указывает, что все позиции содержат изотоп, но его распределение между позициями необязательно равномерно: [G-¹⁴C]глюкоза. В последнем случае достаточно писать: [¹⁴C]глюкоза.

Приставка, указывающая изотоп, ставится перед той частью названия вещества, к которой она относится: йод[¹⁴C]уксусная кислота, 1-амино-[¹⁴C]метилциклопентанол (H₂N¹⁴CH₂C₃H₈OH), фруктозо-1,5-[1-³²P]дифосфат. Термины типа [¹³¹I]-меченный альбумин не следует сокращать до [¹³¹I]альбумин, поскольку нативный альбумин не содержит йода; приемлемо обозначение [¹³¹I]йодальбумин.

Если вещество содержит изотопы нескольких элементов, их символы располагаются в алфавитном порядке: [3-¹⁴C, 2,3-D¹⁵N]серин. Дейтерий можно обозначать символами ²H или D, тритий — ³H или T.

Положение изотопа в соединении следует обозначать арабскими цифрами, греческими буквами или приставками, которые помещаются внутри квадратных скобок перед символом изотопа и отделяются от него дефисом:

[1-³H]этанол, L-[α -¹⁴C]лейцин, [карбокси-¹⁴C]лейцин, [3,4-¹⁴C, ³⁵S]метионин, L-[метил-¹⁴C]метионин.

Те же правила применяются и в том случае, если соединения обозначены стандартными символами: [α -³²P]АТР, [³²P]СМР (не СМ³²P!). Однако радиоактивные неорганические фосфат и пирогосфат можно обозначить ³²P_i и ³²PP_i соответственно.

Изотопы в простых молекулах, написанных формулами, обозначаются без квадратных скобок: ¹⁴CO₂, H₂¹⁸O, D₂O, H₂³⁵SO₄, ³²PO₄³⁻ (но [³²P]фосфат). Квадратные скобки не ставятся, когда символ изотопа присоединяется к словам, не являющимся названием определенного соединения, а также к словам, обозначающим групповые названия соединений: ¹³¹I-меченный, ³H-лиганды, ¹⁴C-стероиды, ¹⁴C-аминокислоты.

При описании результатов экспериментов с использованием изотопов радиоактивность следует, если возможно, выражать в абсолютных величинах — кюри (Ки) или беккерелях (Бк), или распадах/мин (DPM), или имп/мин (CPM).

3.3.10. Ниже приведены рекомендации по оформлению конкретных разделов, принятые в международной биохимической литературе [см. *Biochem. J.*, **289**, 1-15 (1993)].

Животные, растения, микроорганизмы. Для всех экспериментальных животных, кроме обычных лабораторных, следует указывать полные родовое и видовое названия; то же относится и к растениям. Необходимо указать разновидности, штаммы и, если возможно, источник материала. В сообщениях о влиянии изменений в питании приводится состав питательных смесей.

Названия микроорганизмов в резюме и при первом упоминании в тексте должны быть приведены **полностью**, с указанием родового и видового названий и напечатаны курсивом (*Italic*); далее по тексту родовое название обозначается одной заглавной (первой) буквой, а видовое печатается полностью. Необходимо указать номер в коллекции, из которой получены микроорганизмы, или номер штамма (прямым начертанием). Если обсуждаются два рода с одинаковой первой буквой, можно использовать сокращения типа *Strep.* и *Staph.*; если в тексте речь идет о семействах (например, эубактерии, молочнокислые бактерии) или о роде в целом (например, стафилококковые), то соответствующие названия печатаются обычным шрифтом.

Центрифугирование. Если условия центрифугирования имеют решающее значение, то следует сообщить необходимые сведения, позволяющие воспроизвести эксперимент: описание центрифужного ротора, количественный состав суспензионной среды, температуру процесса, время работы ротора с постоянной скоростью (исключая время на разгон и торможение), скорость центрифугирования в единицах g , приведенную к усредненному радиусу вращения столбика жидкости. Например, «центрифугирование проводили в течение 15 мин при 2°C и $10\,000\,g$ ($r_{\text{ср}}\,8\text{ см}$)».

При центрифугировании в градиенте плотности нужно указать тип использованной центрифуги и ротора, температуру, состав градиента. Результаты лучше всего представлять в виде зависимости от расстояния до центра ротора, а не от номера фракции; в таком случае не обязательно указывать верхнюю и нижнюю части градиента. Если используются номера фракций, то верх и низ градиента должны быть отмечены.

Ультрацентрифугирование описывается следующими символами и единицами: коэффициент седиментации (не константа) — s ; коэффициент седиментации при нулевых концентрациях в воде при 20°C — $s_{20,\text{в}}^0$; единицы Сведберга — (10^{-13} с) — S ; удельный объем частицы — v ; коэффициент диффузии — D , коэффициент диффузии в воде при 20°C — $D_{20,\text{в}}^0$. Нужно указывать температуру, при которой проводились седиментация и диффузия.

Хроматография. Фотографии и рисунки бумажных и тонкослойных хроматограмм публикуются только тогда, когда несут информацию, которую сложно описать в тексте. Скорость движения вещества относительно фронта растворителя в бумажной или тонкослойной хроматографиях описывается величиной R_f . Соотношение смеси растворителей лучше всего описывать так: бутан-1-ол : CH_3COOH : H_2O (4 : 4 : 1, по объему).

Диаграммы элюирования для колоночной хроматографии должны быть представлены так, чтобы объем элюента возрастал слева направо. Единицы концентрации и объема должны быть указаны. Следует также приводить размеры колонки и, если возможно, ее свободный объем (V_0). Максимум пика элюции характеризуется величиной V_e (объем элюции) или, лучше, коэффициентом распределения (α или K_D). Калибровочные кривые для колонок (зависи-

мость распределения молекулярных масс от V_e или K_D) не представляются.

Электрофорез. Фотографии электрофоретического разделения в гелях публикуются, если содержат важную информацию. В тексте должны быть оговорены состав среды, pH, температура, электрофоретические подвижности (m), рабочее напряжение. Для обозначения изоэлектрических точек используется символ pI .

Ферменты. В вопросах номенклатуры ферментов авторам следует придерживаться рекомендаций последнего издания «Enzyme Nomenclature» (Acad. Press, San Diego, New York, 1992) с учетом дополнений (<http://www.enzyme-database.org/news.php>). Упоминание фермента необходимо сопровождать его номенклатурным номером. В каждой статье следует оговаривать единицы количества ферментов, что может быть сделано в терминах скорости реакции, катализируемой в определенных условиях. Единица СИ для скорости составляет 1 моль превращенного субстрата (или 1 моль образующегося продукта) в 1 секунду. Это значение скорости соответствует единице количества фермента, называемой katal (символ — kat). За единицу активности фермента также можно принять его количество, обеспечивающее иную скорость реакции, например, 1 мкмоль субстрата в 1 мин.

При определении концентрации белков часто используют стандартные белковые растворы (например, БСА); в таких случаях следует указать тип белка, его источник и, если возможно, влажность.

Константы скорости прямых и обратных реакций в многостадийном ферментативном процессе следует обозначать k_{+n} и k_{-n} соответственно. Константа Михаэлиса (K_m) определяется как концентрация субстрата ($[S]$), при которой $v = V/2$, где $V(V_{\text{max}})$ — скорость реакции в условиях насыщения фермента субстратом, v — скорость образования продукта или расходования субстрата. Если в реакции участвуют два субстрата — А и В, то $K_m^A = [A]$ при $v = V/2$ и $[B]$, стремящейся к бесконечности; значение $[A]$ при $v = V/2$ и конечной концентрации В, которая должна быть указана, следует называть кажущейся константой Михаэлиса для А ($K_{m\text{ каж}}^A$). В ферментативной кинетике используются также понятия: K_s — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса, K_i — константа диссоциации фермент-ингибиторного комплекса, $[I]_{50}$ — концентрация ингибитора, вызывающая полумаксимальное торможение

реакции, h — коэффициент Хилла — параметр уравнения Хилла, используемого для описания негиперболических зависимостей v от концентрации субстрата или модификатора [см. также рекомендации по символам и терминологии в ферментативной кинетике в «Arch. Biochem. Biophys.» за 1983 г. (224, 732–740)].

Количество вещества, молекулярная масса и дальтон, молярная концентрация. В Международной системе единиц СИ за единицу количества вещества (n) принят моль — количество вещества, содержащее столько же структурных единиц (молекул, атомов, ионов, электронов или др.), сколько атомов углерода содержит 0,012 — кг углерода¹² (постоянная Авогадро $N_A = 6,02 \cdot 10^{23}$ 1/моль показывает число структурных единиц в 1 моле любого вещества). Молярная масса (M) — масса 1 моля вещества (m/n), имеет размерность г/моль или кг/моль. Ясно, что масса вещества (m , г), количество вещества (n , моль) и молярная масса (M , г/моль) — понятия разные и между ними существует простое соотношение: $m = nM$. Для обозначения массы биохимических объектов преимущественно используют величины относительной молекулярной массы (M_r , прежнее наименование — «молекулярный вес») — отношение массы молекулы вещества к 1/12 массы атома углерода¹², следовательно, величина безразмерная, и молекулярной массы — массы одной молекулы вещества, выраженной в дальтонах (Да — дальтон — 1/12 массы атома углерода¹² или M/N_A). Таким образом, про некий белок можно сказать, что он имеет относительную молекулярную массу 50 000 ($M_r = 50\,000$) или молекулярную массу 50 000 Да (лучше 50 кДа). Некорректно выражать M_r в дальтонах, по всей статье следует использовать либо M_r , либо молекулярную массу (кДа).

При описании растворов следует давать **молярную концентрацию** (М, мМ, мкМ и т.д.), показывающую, сколько молей вещества содержится в 1 л раствора, но не **нормальную концентрацию** (н.). Концентрацию указывают в десятичной системе (0,25 М HCl). Использование процентных выражений концентрации следует уточнять дополнением: m/m или m/V или V/V , например, 5%-ный раствор (m/V) означает 5 г на 100 мл. Для растворов солей, выраженных в процентах, следует указывать, были ли использованы кристаллогидраты или безводные соли.

Нуклеотидная последовательность. Авторам следует помнить, что последовательность нук-

леотидов должна быть определена в обеих цепях ДНК. Для публикации обычно достаточно четкого описания таких определений и наличия полной последовательности.

Степени в таблицах и на рисунках. Часто авторы, желая избежать чисел с большим количеством знаков, в заголовках таблиц или на рисунках используют степени; в таких случаях необходима большая аккуратность. Здесь лучше пояснить примерами: 1) концентрацию 0,00015 М можно записать $15 \cdot 10^{-5}$ М, лучше степень заменить соответствующей приставкой — 0,15 мМ или 150 мкМ; если же речь идет о выражении данной концентрации в таблице или на рисунке, то под заголовком «Концентрация, мМ» следует писать 0,15 или под заголовком «Концентрация, мкМ» — 150, или, если заголовков «Концентрация $\times 10^5$, М», то 15 (но не 15 под заголовком «Концентрация, М $\times 10^5$!); 2) если значение некоего k равно 0,002, то следует писать 2 под заголовком « $10^3 k$ »; если указано 2 под заголовком « $10^{-3} k$ », то это означает, что k равно 2000; 3) сложные количественные выражения записываются аналогично: выражение $1/[S] = 200 \text{ М}^{-1}$ будет выглядеть как 2 под заголовком « $10^{-2}/[S]$, мМ $^{-1}$ » или как 0,2 под заголовком « $1/[S]$, мМ $^{-1}$ ». Удобно пользоваться квадратными скобками для обозначения концентрации.

Комбинация приставки и символа единиц измерения считается одним символом и может возводиться в степень без скобок, например, мМ $^{-1}$ и см 2 .

Буферные растворы следует описывать так, чтобы читатель мог воспроизвести условия эксперимента. Полезно бывает дать в разделе «Материалы и методы» или при первом упоминании полный состав буферного раствора, например: 0,09 М CH_3COONa /0,01 М CH_3COOH , рН 5,6 (это означает, что буферная смесь приготовлена из данных компонентов в указанных концентрациях). Далее по тексту можно коротко указать: 0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 5,6 — суммарную концентрацию всех входящих в раствор ионизированных веществ. Если буфер содержит два и более видов ионизированных веществ, например, пиридин и CH_3COOH , то следует указать концентрацию каждого компонента.

Некоторые буферы широко известны по тривиальным названиям, образованным первыми буквами их химических названий, и не нуждаются в расшифровке.

Для инкубационных сред типа раствора Кребса—Рингера, среды Игла, среды Веймуса

следует дать ссылку на литературный источник либо указать их состав.

Спектры и данные спектроскопии. Полные спектры печатаются только в тех случаях, если они содержат новую или важную информацию. Спектры поглощения в УФ- и видимой областях, флуоресценции, кругового дихроизма и дисперсии оптического вращения должны иметь шкалу длин волн (в нм или мкм). По возможности при описании поглощения, оптического вращения или кругового дихроизма нужно пользоваться терминами молярности. Как указывалось выше, аббревиатуры методов ДОВ, КД, ЭПР, ЭСР, ЯМР являются общепринятыми и не требуют расшифровки.

Видимая и УФ-абсорбционная спектроскопия. Величина $\lg(I_0/I)$ характеризует оптическую плотность раствора; если рассеянием и отражением можно пренебречь, то эта величина практически характеризует поглощение. Если рассеяние учитывается, например, при количественной оценке клеточной плотности в культуре, следует употреблять более общий термин — пропускание (T). В других случаях используется термин «поглощение» (абсорбция, A), но не «экстинкция» или «оптическая плотность». Принятые символы: A — поглощение ($\lg(I/I_0)$), a — удельный коэффициент поглощения (л/г на 1 см), иногда используют $A^{1\%}_{1\text{см}}$; ϵ — молярный коэффициент поглощения (численно равен поглощению 1 М раствора в кювете с длиной оптического пути 1 см), можно использовать единицы л/моль на 1 см или $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, но не $\text{см}^2 \cdot \text{моль}^{-1}$. Длины волн (нм), при которых проводилось измерение, приводят без указания единиц: A_{280} . Знак равенства не пишется между ϵ или A и численной величиной.

ИК-Спектры приводятся в процентах трансмиссии (T) как функция длины волны (в мкм) или частоты (в см^{-1}).

Оптическое вращение описывается величиной удельного вращения $[\alpha]_t^\lambda$, численно равной вращению (в градусах) в растворе с концентрацией 1 г/мл при длине оптического пути 1 дм (10 см), длине волны λ и температуре t . Необходимо указывать концентрацию раствора (г/100 мл) и растворитель, например, $[\alpha]_{420}^{27,5^\circ}$ (2 г на 100 мл метанола). Можно представлять данные в молярном выражении (молярное вращение): $[M] - [\alpha] \cdot M_r$ и $[m] - [\alpha] \cdot M_r/100$.

В случае биополимеров приводят дисперсию оптического вращения за счет усредненного остатка ($[m]_{\text{m.r.w.}}$); размерность $[m] - \text{град} \cdot \text{см}^2/\text{дмоль}$.

Дисперсия оптического вращения характеризуется как изменение $[\alpha]$ или $[m]$ в зависимости от длины волны или частоты.

Круговой дихроизм описывается величиной молярного адсорбционного коэффициента ($\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$, где ϵ_L и ϵ_R — коэффициенты поглощения света, поляризованного по кругу влево и вправо) или молярной эллиптичностью $[\theta]_M$. Для биополимеров часто используют молярные концентрации в расчете на усредненный остаток (M_r). Единицы молярного адсорбционного коэффициента — л/моль на 1 см или $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, единицы молярной эллиптичности те же, что для оптического вращения $[m]$ в расчете на усредненный остаток; соотношение между $\Delta\epsilon$ и $[\theta]_M$ выражается уравнением $[\theta]_M = 3300 \cdot \Delta\epsilon$.

Флуоресцентная спектроскопия. При описании спектров возбуждения и излучения флуоресценции (F) следует указывать, является ли спектр относительным, нормализованным или скорректированным (указать способ коррекции). Данные поляризации флуоресценции и спектры описываются величиной степени поляризации P или анизотропии A , обе величины безразмерные.

Статистическая обработка результатов. Данные значительного числа независимых экспериментов должны быть представлены так, чтобы можно было оценить их воспроизводимость и значимость. Если целью работы являлось определение количественных или статистических характеристик популяции, то существенная информация обычно выражается следующим образом: 1) число независимых экспериментов (повторные измерения на одном животном или результаты, полученные из целого ряда тканей, и т.д. дают только одну независимую оценку); 2) среднее значение; 3) стандартное отклонение; коэффициент вариации стандартной ошибки в оценке среднего значения. Следует ясно указать, использовались ли стандартное отклонение или стандартная ошибка. Удобной формой включения этих данных в таблицу является, например, такая: $263 \pm 2,5$ (10), где цифра в скобках указывает число значений, использовавшихся для подсчета среднего.

Если утверждается значимость результатов, то следует провести тест на определение значимости и оценить вероятность. Если не указано другое, подразумевается, что используется статистика для нормального распределения.

Громоздкие данные, которые трудно или невозможно привести в печатном варианте журнала (такие как большие таблицы идентификации

рованных белков в протеомных исследованиях), рекомендуется давать в виде приложений, которые будут доступны читателю только на интернет-сайте журнала. Текст статьи должен содержать ссылки на такие приложения.

4. Порядок работы с рукописями (рецензирование, редакционная подготовка, корректура)

4.1. Поступившей в редакцию правильно оформленной рукописи присваивается регистрационный номер и фиксируется дата поступления, о чем редакция информирует авторов по электронной почте. **Рукописи, оформленные не по правилам, возвращаются авторам без рассмотрения.**

4.2. Рецензирование. При подаче рукописи авторы могут указать двух потенциальных рецензентов (ФИО, адрес электронной почты) из числа специалистов в данной области исследований, а также тех, чье участие в рецензировании нежелательно.

Все рукописи рассматривает Ответственный ученый секретарь (Executive Editor-in-Chief) и направляет Ответственному Редактору по соответствующей конкретной области исследований; он, в свою очередь, указывает двух-трех специалистов для рецензирования рукописи. Список Ответственных Редакторов и членов редколлегии размещен на сайте журнала, а также на сайтах Biochemistry (Moscow) на порталах Pleiades и Springer.

На основании экспертных заключений редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи и в спорных случаях привлекает дополнительных рецензентов. По решению редколлегии рукопись может быть принята к публикации в представленном виде, отправлена авторам на доработку или отклонена. Основанием для отклонения рукописи являются недостаточно высокие оценки при рецензировании вследствие несоответствия профилю или уровню публикаций журнала.

Рукопись, получившая высшую оценку двух независимых рецензентов, печатается со специальной пометкой «**Ускоренная публикация**» (срок публикации — 1–2 месяца).

В случае необходимости рукопись направляется авторам на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, после чего она повторно рецензируется, и редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости рукописи для публикации. В начале публикуемой статьи приводятся

даты первоначального поступления рукописи в редакцию, поступления после окончательной доработки и принятия к публикации.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение трех месяцев после получения авторами отзывов; в противном случае рукопись рассматривается как вновь поступившая — ей присваивается новый регистрационный номер и ставится новая дата поступления в редакцию.

В журнале принято «одностороннее слепое рецензирование» (single-blind review), т.е. авторам недоступны имена рецензентов, и редакция строго соблюдает конфиденциальность рецензентов. Все редакционные письма авторам идут за подписью Ответственного ученого секретаря журнала.

4.3. С 2003 г. редакция приступила к практике предварительной публикации рукописей (Papers in Press) на сайте Biochemistry (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>) до выхода в свет статьи. На сайте размещаются экспериментальные статьи на английском языке, получившие высшие оценки при рецензировании и принятые к публикации.

4.4. На всех стадиях работы с рукописями, а также для общения с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи адресу электронной почты и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

4.5. Через месяц после сдачи очередного выпуска журнала в печать редакция рассылает авторам по электронной почте корректуру статьи в виде pdf-файла и инструкцию по работе с ней.

На стадии корректуры не допускаются замечания к тексту, рисункам или таблицам. Если все же это необходимо, то вопрос решается редколлекцией; в крайнем случае статья переносится в другой номер.

4.6. Мы приветствуем размещение препринтов — неопубликованных и не прошедших рецензирование рукописей — на серверах препринтов, веб-сайтах авторов или исследовательских организаций. При подаче рукописи в журнал авторы должны проинформировать редакцию о размещении препринта, включая doi и условия лицензирования. После публикации рукописи автор несет ответственность за появление на странице препринта ссылки на публикацию, включая doi и URL-ссылку на опубликованную статью.